



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

Caracterização genômica de isolados de *Xanthomonas citri* causadoras de doenças em culturas tropicais e mecanismos de virulência de *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*

Lucas Pontes de Lucena

**RECIFE-PE
DEZEMBRO – 2023**

LUCAS PONTES DE LUCENA

Caracterização genômica de isolados de *Xanthomonas citri* causadoras de doenças em culturas tropicais e mecanismos de virulência de *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Figueira Aburjaile

RECIFE-PE

DEZEMBRO – 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L935c Lucena, Lucas Pontes de
Caracterização genômica de isolados de *Xanthomonas citri* causadoras de doenças em culturas tropicais e mecanismos de virulência de *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* / Lucas Pontes de Lucena. - 2023. 118 f.
- Orientador: Marco Aurelio Siqueira da Gama.
Coorientadora: Flavia Figueira Aburjaile.
Inclui referências.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2024.
1. Bactérias fitopatogênicas. 2. MEV. 3. Bioinformática. I. Gama, Marco Aurelio Siqueira da, orient. II. Aburjaile, Flavia Figueira, coorient. III. Título

Caracterização genômica de isolados de *Xanthomonas citri* causadoras de doenças em culturas tropicais e mecanismos de virulência de *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*

Lucas Pontes de Lucena

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 20/12/2023

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes (UFRPE)

Prof. Dr. Antônio Roberto Gomes de Farias (Mae Fah Luang University)

Dra. Ana Dulce Botelho Baia (Vitalforce)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela oportunidade de realizar a graduação em agronomia, e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelo mestrado e pelo conhecimento em fitopatologia.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama e à minha coorientadora Profa. Dra. Flávia Figueira Aburjaile, pela orientação e conhecimento imprescindíveis ao meu desenvolvimento profissional e pessoal durante todo o mestrado e doutorado. À Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza pelo apoio e conselhos dados.

À minha noiva Géssyka Albuquerque, pelo amor e apoio em todos os momentos.

À minha família, especialmente meu pai Manoel Lucena (*in memoriam*) por me orientar, apoiar e acreditar em mim em todos os momentos, e a minha mãe Tereza Pontes, pelo carinho, força e ânimo, ao meu irmão Rodrigo Lima, pelos conselhos e conhecimento compartilhados. A todos os familiares que estiveram ao meu lado, me acompanhando e apoiando.

Aos integrantes e colegas do Laboratório de Fitobacteriologia, especialmente Keyla Waleska, Fabiola Vital, Fernanda Corona, David Ferreira, Igor Alexander, José Messias, Adriano Freire, Emanuel Assunção por cada momento compartilhado, de apoio, amizade e crescimento.

Aos professores dos cursos de graduação em Agronomia e pós-graduação em Fitopatologia, pelo conhecimento agrônomo e fitopatológico repassados.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	6
GENERAL ABSTRACT	7
CAPÍTULO I	8
1. INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1. Gênero <i>Xanthomonas</i>	9
1.2. Mecanismos de virulência em <i>Xanthomonas</i>	16
1.2.1 Biofilme	16
1.2.2. Motilidade.....	18
1.3. Bioinformática e genômica no estudo do gênero <i>Xanthomonas</i>	18
1.3.1 CRISPR em <i>Xanthomonas</i>	19
1.3.2 Efetores dos Sistemas de Secreção dos tipos III e IV em <i>Xanthomonas</i>	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO II	29
Genomic sequencing of <i>Xanthomonas citri</i> strains that cause diseases in tropical fruit and cotton plants	30
CAPÍTULO III	74
Draft Genome Sequence of Seven Pigmented Strains of <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardii</i>, the Causal Agent of Cashew Angular Spot	75
CAPÍTULO IV	95
Caracterização de biofilme de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardii</i>, agente causal da mancha angular do cajueiro	96
CAPÍTULO V	117
Conclusões gerais.....	118

RESUMO GERAL

Xanthomonas citri é uma das mais importantes e variadas espécies do gênero *Xanthomonas*, podendo ser dividida em patovares de acordo com a gama de hospedeiros. Dentre os principais patovares de *X. citri* destacam-se *X. citri* pv. *citri*, *X. citri* pv. *anacardii*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, *X. citri* pv. *viticola* e *X. citri* pv. *malvacearum*, agentes causais de doenças nas culturas dos citros, cajueiro, mangueira, videira e algodoeiro, respectivamente. A redução de perdas econômicas na lavoura ocasionadas por esses patógenos depende do estudo aprofundado das características biológicas, patológicas e taxonômicas desses organismos. O biofilme é uma estrutura formada por uma matriz tridimensional de células embebidas em polissacarídeos extracelulares, possibilitando a sobrevivência dessas células em condições ambientais adversas. A motilidade swarming é a movimentação multicelular das bactérias em superfícies sólidas, tendo função de locomover a colônia para escape de condições desfavoráveis ou em direção ao tecido do hospedeiro. Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) são um mecanismo que envolve a aquisição de pequenos trechos de DNA externo, conhecidos como espaçadores, para combater bacteriófagos. Os sistemas de secreção dos tipos III e IV são responsáveis pelo transporte de proteínas e outros metabólitos que têm função direta na sobrevivência, infecção e manutenção das bactérias fitopatogênicas. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo caracterizar a formação de biofilme e a motilidade nos isolados CCRMTAQ11, CCRMTAQ13, CCRMTAQ18, CCRMTAQ24 e CCRMTAQ29 de *X. citri* pv. *anacardii* *in vitro* juntamente com o comportamento *in vivo* através de observações em microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura, caracterizar os genomas e prever sequências dos tipos CRISPR-*cas*, genes relacionados aos sistemas de secreção dos tipos III e IV, analisar e estabelecer as relações filogenômicas e taxogenômicas em diversos isolados de *X. citri*. Em relação à caracterização do biofilme e motilidade em *X. citri* pv. *anacardii*, todos os isolados foram considerados formadores de biofilme médios ou fracos nas análises *in vitro*, as observações realizadas em microscopia ótica não demonstraram crescimento de biofilme no interior do tecido do hospedeiro, enquanto foi possível observar a formação de biofilme nas análises em microscopia eletrônica até 48 horas após a inoculação. As análises de ANI e DDH dos genomas dos isolados sequenciados permitiu identificá-los como pertencentes à espécie *X. citri*. Foram detectadas sequências CRISPR-*cas* em todos os isolados avaliados nesse estudo, assim como foram preditos genes dos sistemas de secreção dos tipos III e IV para todos os isolados sequenciados neste trabalho. Esses resultados contribuirão de maneira relevante para ajudar a compreender os aspectos ecológicos, taxonômicos, evolutivos, de patogenicidade e virulência de *X. citri* pv. *anacardii*, *X. citri* pv. *citri*, *X. citri* pv. *malvacearum*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* e *X. citri* pv. *viticola* o que será útil para o estudo e desenvolvimento de técnicas para manejar as doenças causadas por essas bactérias.

Palavras-chave: Bactérias fitopatogênicas, MEV, Bioinformática.

GENERAL ABSTRACT

Xanthomonas citri is one of the most important and varied species of the genus *Xanthomonas* and can be divided into pathovars according to the host range. Among the main pathovars of *X. citri*, *X. citri* pv. *citri*, *X. citri* pv. *anacardii*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, *X. citri* pv. *viticola*, and *X. citri* pv. *malvacearum* are causal agents of diseases in citrus, cashew, mango, vine, and cotton crops, respectively. Reducing economic losses in agriculture caused by these pathogens depends on an in-depth study of the biological, pathological, and taxonomic characteristics of these organisms. Biofilm is a structure formed by a three-dimensional matrix of cells embedded in extracellular polysaccharides, enabling the survival of these cells in adverse environmental conditions. Swarming motility is the multicellular movement of bacteria on solid surfaces, with the function of moving the colony to escape unfavorable conditions or towards the host tissue. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) is a mechanism that involves acquiring short stretches of external DNA, known as spacers, to combat bacteriophages. The types III and IV secretion systems are responsible for the transport of proteins and other metabolites that have a direct role in the survival, infection, and maintenance of phytopathogenic bacteria. Therefore, this work aimed to characterize biofilm formation and motility in isolates CCRMTAQ11, CCRMTAQ13, CCRMTAQ18, CCRMTAQ24, and CCRMTAQ29 of *X. citri* pv. *anacardii* in vitro together with in vivo behavior through observations in optical microscopy and scanning electron microscopy, as well as characterizing the genomes and predicting sequences of CRISPR-cas types and genes related to types III and IV secretion systems, analyzing and establishing the phylogenomic and taxogenomic relationships in several isolates of *X. citri* pv. *anacardii*, *X. citri* pv. *citri*, *X. citri* pv. *malvacearum*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, and *X. citri* pv. *viticola*. Regarding the characterization of biofilm and motility in *X. citri* pv. *anacardii*, all isolates were considered medium or weak biofilm formers in vitro; observations carried out under optical microscopy did not demonstrate biofilm growth within the host tissue, while it was possible to observe biofilm formation in electron microscopy observations until 48 hours after inoculation. Analysis of the genomes of *X. citri* pathovar isolates demonstrated ANI values greater than 95% and DDH values greater than 70% when compared to type and pathotype isolates of the species *X. citri*, demonstrating that all isolates belong to this species. CRISPR-cas sequences were detected in all isolates evaluated in this study, as well as type III and IV secretion system genes, which were predicted for all isolates sequenced in this work. These results will significantly contribute to helping understand the ecological, taxonomic, evolutionary, pathogenicity, and virulence aspects of *X. citri* pv. *anacardii*, *X. citri* pv. *citri*, *X. citri* pv. *malvacearum*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, and *X. citri* pv. *viticola*, which will be useful for the study and development of techniques to manage diseases caused by these bacteria.

Keywords: Plant pathogenic bacteria, SEM, Bioinformatics.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* Dowson é composto por bactérias Gram-negativas, que possuem formato de bastonete, com tamanho variável entre 0,8 e 2,0 μm , aeróbicas obrigatórias, monotríquias, que apresentam reação negativa para redução de nitrato e produção de urease, e positiva para catalase. A espécie-tipo desse gênero é *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939, agente causal da podridão negra das Brássicas (SADDLER; BRADBURY, 2005). Uma outra importante característica do gênero *Xanthomonas* é a produção da xantomonadina, um pigmento que confere às colônias coloração amarelada, embora haja espécies/patovares integrantes do gênero que não apresentam a produção desse pigmento, como *X. citri* pv. *viticola*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* e *X. populi* (CATARA et al., 2021), e ainda aqueles que apresentam isolados pigmentados e apigmentados, como de *X. citri* pv. *anacardii* (GAMA et al., 2011; GAMA et al., 2018) e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (GONÇALVES; ROSSATO, 2000; MUNHOZ et al., 2011).

Dentro do gênero *Xanthomonas* pode-se observar mais de 30 espécies bacterianas (PARTE et al., 2020), das quais, várias de importância agrônômica/fitopatológica, tais como *X. campestris* e *X. axonopodis*, e seus diversos patovares, com diversas características bioquímicas e moleculares capazes de distingui-los (KADO, 2010). Embora se trate de um gênero com capacidade de infectar mais de 120 espécies de monocotiledôneas e mais de 250 espécies de dicotiledôneas (SADDLER; BRADBURY, 2005), em geral os isolados de *Xanthomonas* apresentam uma tendência à especificidade de hospedeiros (PRUVOST et al., 2016), sendo comumente divididos em patovares, termo que classifica isolados a nível infrasubespecífico com base na gama de hospedeiros (YOUNG et al., 1978).

Quando na presença de meios com glicose, as bactérias do gênero tendem a produzir exopolissacarídeos conhecidos como goma xantana, os quais são capazes de fazer com que as colônias assumam um aspecto brilhoso, amarelo e mucoide (KADO, 2011), podendo ser utilizado pela indústria na formulação de diversos produtos químicos, inclusive para fins de alimentação. Esse biopolímero apresenta como função o aumento da viscosidade de fluidos, aumentando a estabilidade em condições ambientais adversas (GARCIA-OCHOA, 2000).

Apesar dessa extensão de espécies capazes de hospedar bactérias do gênero, os isolados de *Xanthomonas* apresentam um alto nível de especificidade, podendo se restringir a famílias ou mesmo espécies botânicas (JACQUES *et al.*, 2016). Nesse contexto, os potenciais danos causados no cenário agrícola mundial caracterizam o gênero como um dos mais relevantes da fitopatologia, compondo um terço do grupo das dez principais bacterioses estudadas, em levantamento realizado por Mansfield *et al.*, (2012).

A sobrevivência de espécies de *Xanthomonas* ocorre na rizosfera e na filosfera de hospedeiros alternativos (SILVA *et al.*, 2017), de forma epifítica ou endofítica nos tecidos foliares (PRUVOST *et al.*, 2009), cancrs, brotos dormentes e cicatrizes nas folhas (LAMICHHANE, 2014). Os genes do grupo *hrp*, associados à patogenicidade, são também relatados como relacionados à sobrevivência de espécies e patovares do gênero *Xanthomonas* por se relacionarem a genes responsáveis pela síntese de moléculas que compõem o biofilme (BÜTTNER; BONAS, 2010).

A disseminação das espécies e patovares de *Xanthomonas* ocorre através de respingos de chuva, frutos e material de propagação infectados (tanto na forma sintomática quanto na forma assintomática), máquinas e ferramentas de tratos culturais, solo infectado, e possivelmente, através de insetos vetores (TOSTES *et al.*, 2014; KASTELEIN *et al.*, 2018). A penetração no hospedeiro pode ocorrer via aberturas naturais (principalmente os estômatos e hidatódios), porém pode também ser favorecida por ferimentos causados por podas e outros tratos culturais, aerossóis provenientes de irrigação por aspersão ou microaspersão, ou por injúrias causadas por insetos (RYAN *et al.*, 2011; MENDONÇA; ZAMBOLIM; BADEL, 2017).

O manejo de bactérias do gênero *Xanthomonas* inclui técnicas diversificadas, mas basicamente são práticas integradas e relacionadas ao controle cultural, como adubação balanceada, controle de insetos, implementação de cultivares diversificadas e uso de material propagativo livre do patógeno (LAMICHHANE, 2014). O controle químico pode também ser utilizado no manejo de *Xanthomonas* por meio da aplicação preventiva de fungicidas cúpricos (MENDONÇA; ZAMBOLIM; BADEL, 2017). Em alguns casos, o controle biológico também é recomendado, entre os procariotos, as bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* são considerados eficientes no manejo de algumas doenças causadas por espécies *Xanthomonas* (THAPA; BABADOOST, 2016).

1.2. *Xanthomonas citri*

A espécie *X. citri* é considerada o grupo mais heterogêneo dentro do gênero *Xanthomonas* (WANG *et al.*, 2019), com mais de 35 patovares (FERREIRA *et al.*, 2019; BANSAL *et al.*, 2022). Inicialmente, os isolados dessa espécie foram classificados em *X. campestris*, sendo distintos apenas a nível de patovar, entretanto, análises baseadas em hibridização de DNA, reclassificaram esses isolados para a espécie *X. axonopodis* e seus diferentes patovares (VAUTERIN *et al.*, 1995). Estudos posteriores baseados em técnicas moleculares de consenso intergênico repetitivo enterobacteriano (ERIC) e palindrômicas extragênicas repetidas (REP) e BOX-A1R-based repetitive extragenic palindromic-PCR realizaram o agrupamento desses isolados em dois clados (9.5 e 9.6) e reposicionaram-nos na espécie *X. citri* (RADEMAKER *et al.*, 2005; CONSTANTIN *et al.*, 2016).

O patovar *X. citri* pv. *citri* (Hasse) Gabriel *et al.* é o agente causal do cancro cítrico (EUZEBY *et al.*, 2007). A doença, de origem asiática, possui ampla relevância na citricultura do Brasil e do mundo, sendo uma das principais doenças da cultura, por conta do seu potencial de dano a nível qualitativo e quantitativo, podendo ainda inviabilizar a exportação do produto para regiões consideradas livres do patógeno (BEHLAU; BELASQUE, 2014).

No Brasil, a bactéria foi relatada pela primeira vez no estado de São Paulo, no ano de 1957, sendo considerada de grande importância a partir do mesmo ano, no qual foram tomadas as primeiras medidas com o objetivo de conter o patógeno, incluindo medidas como a eliminação de plantas assintomáticas em um raio de 12 metros ao redor de plantas que apresentavam sintomas do cancro cítrico (BEHLAU, 2020).

Os sintomas causados por *X. citri* pv. *citri* são inicialmente pontos escuros, comumente rodeados por amarelecimento e encharcamento, que evoluem para pústulas de cor marrom-clara, que escurecem e tomam aspecto saliente. Esses sintomas podem ocorrer em todas as partes verdes da planta, mas são observados principalmente na face abaxial das folhas e nos frutos. Sob severidades mais altas, os sintomas podem ser observados em ambas as faces foliares e nos ramos, além dos frutos, as lesões podem também apresentar tamanhos que podem atingir 1 centímetro. Outros importantes sintomas de infecções são a desfolha e o abortamento de frutos, sendo esse último um fator que reforça a importância qualitativa dos danos causados pela doença (BEHLAU, 2020; BEHLAU, BELASQUE, 2014).

De forma geral, a bactéria é introduzida nos pomares através de material propagativo infectado. Em curtas distâncias, os principais fatores de disseminação da

bactéria são o vento e respingos de chuva, assim como respingos provenientes de irrigação. Em relação à temperatura, o patógeno é favorecido em ambientes com médias entre 29,5 e 39 °C. Para penetrar nas plantas, a bactéria utiliza aberturas naturais, como os estômatos, ou lesões mecânicas causadas por tratos culturais, insetos ou contato entre plantas (AMORIM *et al.*, 2016).

O manejo do cancro cítrico pode ser realizado de forma preventiva, utilizando material propagativo livre do patógeno, evitando o plantio de citros em locais com de alta incidência de ventos fortes. Outras importantes medidas de controle são a desinfecção de material utilizado nos tratos culturais e eliminação de plantas doentes (AMORIM *et al.*, 2016). O controle do inseto minador, assim como o uso de quebra ventos combinado com a aplicação preventiva de fungicidas cúpricos pode reduzir significativamente a incidência da doença em pomares (BEHLAU *et al.*, 2020).

A bactéria *X. citri* pv. *anacardii* é responsável por causar a mancha angular do cajueiro, embora tenha ganho relevância no cultivo econômico do cajueiro a partir de 2006 (CARDOSO *et al.*, 2013; VIANA *et al.*, 2006). Uma importante característica particular do patovar é a possibilidade da observação tanto de isolados de coloração branca como de coloração amarela, característica pouco conhecida até a última década (GAMA *et al.*, 2011; GAMA *et al.*, 2018).

A primeira observação da mancha angular do cajueiro no Brasil foi relatada no ano de 1981 por Robbs *et al.*, (1981), tendo então sua etiologia atribuída à bactéria *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, agente causal da mancha angular da mangueira. Em 2003, no estado do Piauí, a doença foi relatada como mancha de *Xanthomonas* do cajueiro, ocasião na qual os sintomas incluíam necrose nas nervuras, sendo até então atribuída a *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (VIANA *et al.*, 2006), estudos posteriores demonstraram se tratar da mancha angular do cajueiro, porém em estado de severidade mais avançado (LUCENA, 2019). Posteriormente foram realizados estudos filogenéticos que possibilitaram o esclarecimento do agente causal da mancha angular e da mancha de *Xanthomonas* do cajueiro, que estabeleceram a etiologia atual das doenças (AH-YOU *et al.*, 2009; CONSTANTIN *et al.*, 2016; GAMA *et al.*, 2018).

Os sintomas da mancha angular do cajueiro são manchas inicialmente encharcadas nas folhas, que progridem e tornam-se necróticas, com coloração marrom a marrom-escuro, sendo restritas pelas nervuras. Conforme a doença evolui, ocorre necrose nas nervuras foliares, podendo ser observadas lesões necróticas no fruto e no pseudofruto do

cajueiro, incrementando a sua importância econômica em áreas de produção (GAMA et al., 2013; ZOMBRE et al., 2016).

As condições ambientais que favorecem *X. citri* pv. *anacardii* são temperaturas na faixa dos 26-30 °C e umidade relativa do ar em torno de 80% (ZOMBRE et al., 2016). A disseminação da bactéria é favorecida através da irrigação por aspersão, possibilitando a liberação e a penetração do patógeno através de microlesões causadas nos tecidos, chuvas e ventos fortes também favorecem a dispersão das células bacterianas. Em longas distâncias, a principal forma de disseminação é através da introdução de material propagativo infectado (GAGNEVIN; PRUVOST, 2001). A sobrevivência de *X. citri* pv. *anacardii* pode ocorrer na forma epifítica ou endofítica nos tecidos foliares (PRUVOST et al., 2009).

As formas de manejo de *X. citri* pv. *anacardii* se dão por meio da prevenção da entrada do patógeno na área, utilizando material propagativo sadio, realização de podas de limpeza e aplicações preventivas de oxicleto de cobre durante o período chuvoso até as castanhas tomarem coloração verde (VIANA et al., 2006).

A primeira ocorrência de *X. citri* pv. *viticola* no Brasil, agente causal do cancro bacteriano da videira, foi realizada no ano de 1998, na região do Submédio do Vale do Rio São Francisco (MALAVOLTA JÚNIOR et al., 1999). Quando isolada em meio de cultura, a bactéria forma colônias de coloração branca, e isso se dá por conta da incapacidade da produção de xanthomonadina (MIDHA; PATIL, 2014).

Com relação aos sintomas causados durante a incidência do cancro bacteriano da videira, observam-se inicialmente pontos necróticos nas folhas, podendo apresentar halo amarelado ao seu redor. Conforme a doença progride essas lesões tendem a aumentar e coalescer, esse padrão de lesão pode também ocorrer cachos e nos ramos, neste último caso podendo exibir fissuras longitudinais. Nos frutos também são observadas lesões necróticas, podendo levar a murchas nas bagas (NAYUDU, 1972; NASCIMENTO; MARIANO, 2004; GAMA et al., 2013).

Xanthomonas citri pv. *viticola* é favorecida por temperaturas entre 25-30 °C e alta umidade relativa do ar. A longas distâncias, a disseminação da bactéria ocorre de forma similar a outros patógenos de *Xanthomonas*, sendo introduzida por meio de material propagativo infectado, ainda que assintomático. Em curtas distâncias, a *X. citri* pv. *viticola* pode ser disseminada através de máquinas e ferramentas de tratos culturais infectadas, vento juntamente com respingos de chuva ou água de irrigação (NASCIMENTO; MARIANO, 2004).

A sobrevivência de *X. citri* pv. *viticola* pode ocorrer em restos culturais infectados, por meio de hospedeiros alternativos, como a soja perene (*Glycine* sp.) e o caruru (*Amaranthus* sp.), ou de forma epifítica em órgãos de parte aérea da planta (PEIXOTO et al., 2007). O manejo da bactéria é prioritariamente preventivo, evitando-se a introdução de mudas e enxertos infectados, mas outras medidas também são indicadas para fins práticos, como o uso de quebra-ventos, manejo de irrigação, desinfestação de ferramentas de tratos culturais e destruição de restos culturais. Outra importante medida de controle é o uso de cultivares com resistência moderada a alta, a fim de reduzir as perdas ocasionadas pelo patógeno (NASCIMENTO; MARIANO, 2004; GAMA et al., 2013).

Xanthomonas citri pv. *mangiferaeindicae* é o agente causal da mancha angular ou mancha bacteriana da mangueira, uma das mais importantes doenças da mangueira, capaz de limitar a produção de manga em regiões tropicais e subtropicais de todo o planeta. Além de sua ampla distribuição geográfica, o patógeno é capaz de infectar diversas variedades da cultura, podendo causar perdas de até 100% nas lavouras (PRUVOST et al., 2014; HONGER et al., 2021).

A bactéria pode ser observada também nas formas epifítica e endofítica, tanto em condições laboratoriais quanto no campo, sendo capaz de formar biofilme em ambas as condições. É possível obter isolados epifíticos e endofíticos de *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* a partir de folhas, ramos e frutos, embora sua importância nessas formas não esteja esclarecida até o momento (PRUVOST et al., 2009).

A mancha angular da mangueira pode incidir todas as partes aéreas da planta (GANGNEVIN; PRUVOST, 2001). Os sintomas se iniciam com a formação de manchas aquosas nas folhas, conforme a doença evolui, as manchas escurecem, com coloração marrom escura a preta, podendo ou não apresentar halo amarelado ao redor das lesões. De forma geral, as manchas são delimitadas pelas nervuras foliares, apresentando o aspecto de mancha angular que dá nome à doença. Os sintomas ocasionados por *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* também podem ser observados nos frutos da mangueira, inicialmente com manchas encharcadas nas lenticelas, que posteriormente evoluem para manchas negras, que podem exsudar goma infecciosa (PRUVOST et al., 2014), além de folhas e frutos, os ramos também podem ser infectados (ZOMBRÉ et al., 2016).

A disseminação da bactéria a longas distâncias ocorre através de material propagativo infectado. Assim como outras bactérias da mesma espécie, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* é dispersa em curtas distâncias por meio da combinação de chuva ou água de irrigação juntamente com a ação do vento. O homem pode atuar como agente

disseminador através do uso de ferramentas infestadas durante a execução dos tratos culturais na lavoura. Fortes rajadas de vento também são capazes de provocar ferimentos que favorecem a entrada do patógeno no hospedeiro (GAGNEVIN; PRUVOST, 2001).

O manejo integrado da bactéria inclui medidas preventivas, como uso de material propagativo livre do patógeno para impedir a introdução da mancha angular na lavoura. Inspeções em períodos de maior umidade, irrigação localizada, aplicação de quebra-ventos e podas que favoreçam a aeração do pomar também são recomendadas no controle preventivo da doença (ARAÚJO et al., 2019). A desinfestação de materiais utilizados nos tratos culturais e a destruição de restos de cultura de plantas infectadas reduzem a população da bactéria e consequentemente a quantidade de inóculo para novas infecções. Em relação ao controle químico, os compostos cúpricos são o principal grupo indicado para o combate à *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, tanto em suas formas epifíticas e endofíticas, quanto quando o patógeno já está causando doença no campo (GAGNEVIN; PRUVOST, 2001; HONGER et al., 2021).

Xanthomonas citri pv. *malvacearum* é o agente causal da mancha angular ou queima bacteriana do algodoeiro, uma das principais doenças da cultura, registrada em quase todas as áreas de produção em todo o planeta (ELASSBLI et al., 2021), sendo capaz de infectar o hospedeiro em todos os estágios de desenvolvimento, podendo causar perdas de mais de 57 mil fardos de algodão (MIJATOVIĆ et al., 2021), reduzindo até 80% da produção (HILLOCKS, 1992; JALLOUL et al., 2015).

O patógeno é capaz de infestar sementes e infectar plantas desde os estágios iniciais de desenvolvimento. Os sintomas causados por *X. citri* pv. *malvacearum* podem ser vistos em toda parte aérea da planta. Nas folhas, o encharcamento é o primeiro sintoma observado, que posteriormente progride para manchas angulares limitadas pelas nervuras. Também podem ser observadas lesões necróticas e desfolha quando a doença incide em variedades mais suscetíveis. O sintoma de queima pode ocorrer nas fases iniciais de desenvolvimento das plântulas, além de ocorrer também nas maçãs, no início da fase produtiva da cultura (JALLOUL et al., 2015).

As condições ambientais favoráveis à doença são umidade relativa de 85% e temperaturas na faixa de 30-40 °C. Chuvas e ventos atuam como agentes dispersantes de inóculo na lavoura (WANG et al., 2019). A longas distâncias e em locais sem a ocorrência prévia da bactéria, a principal forma de disseminação é o uso de sementes infestadas com o patógeno (JALLOUL et al., 2015).

As principais medidas de controle de *X. citri* pv. *malvacearum* são preventivas (WHEELER *et al.*, 2022), como o uso de sementes saudáveis e variedades resistentes, sendo conhecidos pelo menos 22 genes ou combinações de genes que são fontes de resistência à mancha angular do algodoeiro (BRAGA *et al.*, 2016). Recentemente, estudos demonstraram que o uso de exopolissacarídeos apresentam potencial de redução da severidade da doença agindo como um indutor de resistência em plantas de algodoeiro através do estímulo à produção de compostos e enzimas de defesa (KESHKEIH *et al.*, 2019).

1.2. Mecanismos de virulência em *Xanthomonas*

1.2.1. Biofilme

O biofilme caracteriza-se como uma estrutura formada por um complexo multicamada de células inseridas em uma matriz de polissacarídeos extracelulares (EPS), lipídios, proteínas e DNA extracelular (MINA *et al.*, 2019), sendo um dos fatores de virulência das espécies do gênero *Xanthomonas* (DANHORN; FUQUA, 2007). O biofilme atua diretamente na adesão das células a superfícies, possibilitando que as células sobrevivam no ambiente respondendo estímulos do ambiente externo, além de permitir a troca de material genético dentro da matriz, gerando assim variabilidade nas bactérias (SHAFIEI *et al.*, 2021). Portanto, é possível afirmar que o biofilme é um mecanismo relevante para patogenicidade das fitobactérias, bem como para o desenvolvimento de estratégias de manejo (GUERRA *et al.*, 2017).

Os mecanismos metabólicos relacionados ao biofilme são altamente específicos, dessa forma, moléculas presentes na superfície e no interior do hospedeiro funcionam como estímulos bioquímicos que regulam o comportamento das células bacterianas presentes no biofilme (SENA-VELEZ *et al.*, 2014). Neste contexto, o quorum sensing (QS) exerce uma função essencial de percepção desses sinais para a regulação das respostas aos estímulos através da expressão diferencial de diferentes grupos de genes, que podem estar relacionados à adesão, transporte de moléculas e secreção de efetores e enzimas (MINA *et al.*, 2019). O QS atua através da comunicação célula-célula através de moléculas autoinduzidas secretadas e percebidas entre bactérias da mesma espécie (FUQUA *et al.*, 1994).

Embora se trate de um importante mecanismo na interação patógeno-hospedeiro de diversas espécies de fitopatógenos, a formação de biofilme em isolados do gênero *Xanthomonas* apresenta diferentes níveis, inclusive entre isolados de uma mesma espécie, demonstrando que há outros fatores que influenciam na patogenicidade desses isolados (GUERRA *et al.*, 2017). Estudos realizados em *X. citri* pv. *citri* reiteram o biofilme como fator de virulência, sugerindo que esta estrutura facilita a penetração do patógeno nos estômatos, porém não sendo sempre essencial para a patogenicidade desse organismo (SENA-VELEZ *et al.*, 2014). É importante observar que outros mecanismos como os efetores do sistema de secreção do tipo III e enzimas que degradam a parede celular podem atuar juntamente na regulação da virulência e da patogenicidade das fitobactérias (MINA *et al.*, 2019).

A formação de biofilme em bactérias fitopatogênicas tem sido dividida em cinco diferentes etapas, a saber: adesão reversível de células planctônicas, adesão irreversível, formação de matriz de EPS, maturação do biofilme e dispersão (JANISSEN *et al.*, 2015). É possível ainda observar que a formação e o desenvolvimento do biofilme são influenciados por fatores ambientais como temperatura, umidade relativa do ar, pH e nutrientes exógenos (SENA-VELEZ *et al.*, 2014).

A inibição do biofilme tem sido estudada para promover o manejo de fungos e bactérias fitopatogênicos, sendo realizada por meio de diversos compostos, como extratos vegetais e metabólitos secundários (SHAFIEI *et al.*, 2021). Alguns estudos também indicam que a aplicação foliar da indol-3-acetonitrila (IAN) e da D-leucina apresenta potencial de inibir a produção de biofilme em *X. citri* pv. *citri* e aumentar a sensibilidade ao cobre, reduzindo significativamente a capacidade patogênica da bactéria e a severidade do cancro cítrico em áreas aplicadas (LI; WANG, 2014).

As espécies de *Xanthomonas* são capazes de formar biofilme com estruturas de aspectos morfológicos distintos, podendo apresentar aspecto monocamada, como isolados da espécie *X. campestris* (DOW *et al.*, 2003), ou agregados de células sobrepostos sobre a superfície do hospedeiro, como observado em *X. citri* pv. *citri*, há também isolados que apresentam comportamentos variáveis. Estudos realizados com *X. alfae* subsp. *citrumelonis* demonstra que as células podem se agregar formando pequenos blocos, ou se agrupar formando estruturas semelhantes a fios contendo várias células bacterianas na região próxima aos estômatos do hospedeiro (SENA-VELEZ *et al.*, 2015). O comportamento também varia entre estruturas monocamada e multicamadas em *X. arboricola* pv. *pruni* (SABUQUILLO; CUBERO, 2021).

1.2.2. Motilidade

A motilidade swarming é um movimento multicelular de células bacterianas em superfícies sólidas. Essa movimentação permite à bactéria escapar de estresse local, se locomover em direção a ambientes nutricionalmente favoráveis e penetrar os tecidos do hospedeiro com eficácia, apesar de depender da umidade superficial para ocorrer. Assim como o biofilme, a motilidade swarming também é regulada através do QS, que promoverá estímulos químicos que induzirão ou inibirão a motilidade da colônia de acordo com o ambiente (VENIERAKI *et al.*, 2016).

Em *Xanthomonas*, a motilidade swarming já foi detectada previamente, sendo possível inclusive verificar que os genes *pilG*, *pilH*, *HpaS* e *VemR* atuam na regulação da motilidade em *X. campestris* (QI *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2019). Estudos demonstraram que a motilidade swarming está intimamente ligada aos pili e aos flagelos e são essenciais para que a bactéria se fixe no tecido do hospedeiro e dê início ao processo de infecção, sugerindo que possa se tratar de um fator de patogenicidade em *X. campestris* pv. *campestris* (QI *et al.*, 2020). A importância da motilidade swarming também foi verificada em *X. vesicatoria*, onde o mecanismo apresentou correlação significativa com a formação de biofilme, com a produção de goma xantana, (FELIPE *et al.*, 2018).

Em *X. citri*, o gene *VacJ* é associado diretamente à motilidade swarming, além de regular outras características do patógeno como o biofilme e a virulência (LI; YU, 2020). Outros estudos com essa espécie também demonstram que a temperatura exerce influência sobre a motilidade swarming, tendo reduzido significativamente sua atividade na temperatura de 15 °C (LIAO *et al.*, 2019).

1.3. Bioinformática e genômica de *Xanthomonas*

Recentemente, as tecnologias relacionadas à biologia molecular têm avançado de forma significativa, possibilitando o desenvolvimento do sequenciamento genômico com uma celeridade sem precedentes, trazendo consigo uma quantidade de dados sobre os organismos, e, utilizando algoritmos eficientes capazes de transformar esses dados em informações biológicas (ALEMU, 2015).

Na fitopatologia, essas informações são ferramentas essenciais para o esclarecimento da biologia e da etiologia dos fitopatógenos - dos quais as bactérias

representam um importante grupo - assim como suas relações com o ambiente e com os hospedeiros, sem a necessidade de ter esses organismos em laboratório para realizar esses estudos (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2018).

Entre as técnicas utilizadas na bioinformática aplicada à fitobacteriologia podem-se destacar as análises genômicas, que se aplica através do sequenciamento do genoma completo do fitopatógeno, seguido pelas análises através de programas especializados. No Brasil, o emprego dessa técnica foi observado pela primeira vez quando do sequenciamento da bactéria *Xylella fastidiosa* Wells et al. 1987, agente causal da clorose variegada dos citros, que possibilitou análises sobre estruturas e funções gênicas específicas do patógeno (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2018).

Em relação ao gênero *Xanthomonas* são aplicadas diversas técnicas de estudos genômicos, dos quais pode-se destacar as análises comparativas funcionais e estruturais. As análises comparativas funcionais se baseiam no estudo de funções metabólicas que podem ser inferidas a partir de sequências codificantes (CDS's – ou coding sequences, em inglês) do genoma do organismo. Isto permite a classificação de acordo com a função metabólica exercida pela CDS, um exemplo de aplicação das análises funcionais é a verificação de características específicas, como aquelas relacionadas a genes de patogenicidade e virulência (BUTTNER; BONAS, 2010), a funções metabólicas de sobrevivência e à interação patógeno-hospedeiro (QIAN et al., 2005).

Um importante exemplo de análise comparativa funcional foi o trabalho realizado por Qian et al., (2005), que esclareceu diversas funções relacionadas ao metabolismo de isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, incluindo segmentos inteiros responsáveis por domínios funcionais relacionados à regulação celular e à síntese do sistema de secreção tipo IV (SST4), bem como também comparou algumas dessas funções com outras bactérias de importância fitopatológica, como *X. citri* pv. *citri* e *Rhizobium radiobacter* (Beijerinck and van Delden 1902) Young et al. 2001.

As análises comparativas estruturais de *Xanthomonas* estão relacionadas às CDS responsáveis pelas estruturas biológicas do gênero, sendo observadas quanto à síntese de compostos metabólicos com potencial essencialidade à sobrevivência do patógeno ou à sua adaptação ao meio.

1.3.1 CRISPR em *Xanthomonas*

Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) são um mecanismo de defesa presentes nas archaeas e bactérias contra bacteriófagos, onde pequenos fragmentos de DNA exógeno chamados espaçadores são adquiridos, de forma a criar uma “memória de defesa” contra parasitas subsequentes que os possuam. Além das CRISPR, há as proteínas associadas (*cas*) que atuam juntamente para a promoção de um sistema com dois componentes: O locus CRISPR, onde se encontram os trechos do DNA externo inseridos entre sequências repetidas e inversas, todas elas curtas, originárias da própria bactéria, e um conjunto de sequências genéticas situadas nos arredores do locus CRISPR, as quais têm a função de criar proteínas *cas*, encarregadas de clivar o DNA externo caso ocorra uma nova invasão do mesmo invasor (FURTADO et al., 2021).

Em *X. citri* já foram detectadas diversas sequências CRISPR-*cas*, permitindo estudos relacionados à epidemiologia, evolução e genética populacional da espécie. Neste contexto, a avaliação das sequências dos espaçadores proporciona uma grande quantidade de informações sobre esses organismos, inclusive possibilitando a eventual substituição ou combinação com métodos moleculares tradicionalmente aplicados à filogenia da espécie (JEONG et al., 2019). Além das relações evolutivas, o estudo de sequências CRISPR-*cas* permite acessar relações geográficas, esclarecendo características filogeográficas em *X. citri* pv. *citri*, auxiliando na identificação de particularidades de isolados que podem ser aplicadas ao manejo do patógeno, como o conhecimento da gama de hospedeiros (JEONG et al., 2019).

Além de *X. citri* pv. *citri*, as sequências CRISPR-*cas* já foram detectadas em outros patovares, como *X. citri* pv. *anacardii*, *X. citri* pv. *punicae* e *X. citri* pv. *cajani*, demonstrando que se trata de um mecanismo comum na espécie, com o potencial de fornecimento de informações que ampliem os dados utilizados como substrato para estudos filogenéticos e desenvolvimento de novas técnicas de manejo da espécie (LUCENA et al., 2023; BELLANGER et al., 2022).

ANI e dDDH

1.3.2 Efetores dos Sistemas de Secreção dos tipos III e IV em *Xanthomonas*

O estabelecimento de uma infecção por bactérias fitopatogênicas depende de sistemas de efluxo de proteínas e toxinas que atuam como fatores de virulência e patogenicidade, permitindo a obtenção de moléculas essenciais à sobrevivência do patógeno. Dessa forma, essas rotas utilizadas pelas fitobactérias para estabelecer a infecção são chamadas de sistemas de secreção, que são numerados atualmente do 1 ao 11 (MAPHOSA et al., 2023). Em relação às bactérias fitopatogênicas, os sistemas de secreção identificados mais relevantes são os dos tipos I, II, III, IV, V e VI (KADO, 2010).

O sistema de secreção do tipo III (SST3) é codificado por mais de 40 genes provenientes do plasmídeo ou de ilhas de patogenicidade do cromossomo. O SST3 é composto por mais de 20 proteínas estruturais, tendo uma complexa regulação, dependendo de fatores como temperatura, concentração de cálcio e magnésio, presença de flavonoides e pH para o seu pleno funcionamento. O contato físico direto entre a bactéria e o hospedeiro também pode ativar o SST3 (GAMA et al, 2013). Em espécies do gênero *Xanthomonas*, o SST3 é responsável pela secreção de diversas proteínas, como as codificadas pelos genes *hrp*, podendo atuar codificando efetores ou ter função na translocação destes. O SST3 também apresenta função de regulação do biofilme, uma vez que a ausência do sistema acarreta mudanças na expressão de proteínas envolvidas na motilidade, produção de energia e síntese de EPS (ZIMARO et al., 2014). Todos os SST3 são responsáveis pela mediação da injeção de fatores de virulência dentro da célula do hospedeiro, podendo desencadear cascatas de sinais metabólicos resultando na infecção (Kado, 2010). A função específica da maioria das proteínas efetoras é desconhecida, porém há uma grande quantidade conhecida dessas proteínas secretadas por espécies do gênero *Xanthomonas*, incluindo *X. citri* (Lucena et al., 2023).

O SST4 é um dos mais conservados nas bactérias, sendo responsável pelo transporte de proteínas, nucleoproteínas e ácidos nucléicos, sendo observados em bactérias gram-positivas e gram-negativas, adaptadas a diversos ambientes e hospedeiros, incluindo isolados fitopatogênicos (KADO, 2010). Esse sistema é capaz de obter DNA do ambiente externo ou de outra célula para a sobrevivência da bactéria, assim como transferi-lo para células eucarióticas durante o processo de infecção. Embora *Rhizobium*

seja o gênero de bactérias fitopatogênicas mais estudado para o SST4, em *Xanthomonas* esse sistema de secreção já foi detectado em diversas espécies, assim como nos patovares *X. citri* pv. *citri* e *X. citri* pv. *anacardii* (DUNGER et al., 2014; LUCENA et al., 2023).

Diante da demanda de novas alternativas para o desenvolvimento de técnicas de manejo integrados que vise reduzir significativamente as perdas ocasionadas por *X. citri*, e o potencial do estudo dos mecanismos de biofilme, motilidade, sistemas de secreção dos tipos III e IV e sequências CRISPR-cas aplicadas à espécie *X. citri* e seus diferentes patovares este trabalho teve como objetivos: I) Caracterizar os mecanismos de biofilme e motilidade swarming em *X. citri* pv. *anacardii* através de abordagens *in vitro* e *in vivo* II) Montar e anotar o genoma *in silico*, analisar filogenomicamente e taxogenomicamente, analisar a presença de sequências CRISPR-cas, verificar a presença de genes codificantes para proteínas efetoras dos SST3 e SST4 em isolados de *X. citri* pv. *citri*, *X. citri* pv. *anacardii*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, *X. citri* pv. *viticola* e *X. citri* pv. *malvacearum* e comparar com outros isolados de *X. citri*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMU, K. **The Role and Application of Bioinformatics in Plant Disease Management.** p. 7, 2015.

ARAUJO, M. R., LEÃO, G. M., SILVA, R., OLIVEIRA, A. I., SILVA, J. F. 2019. Mancha-Bacteriana da Mangueira (*Xanthomonas campestris* pv. *Mangiferaeindicae*). **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins.** 6:31–35.

BANSAL, K.; KUMAR, S.; PATIL, P. B. Phylo-Taxonogenomics Supports Revision of Taxonomic Status of 20 *Xanthomonas* Pathovars to *Xanthomonas citri*. **Phytopathology**, v. 112, n. 6, p. 1201–1207, 1 jun. 2022.

BEHLAU, D. F. et al. **Relative contribution of windbreak, copper sprays and leafminer control for citrus canker management and prevention of crop loss in sweet orange trees.** Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-10-20-2153-RE>>. Acesso em: 4 jan. 2021.

BEHLAU, F. An Overview of Citrus Canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, 24 jun. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40858-020-00377-2>>. Acesso em: 4 jan. 2021.

BEHLAU, F.; BARELLI, N. L.; JR, J. B. LESSONS FROM A CASE OF SUCCESSFUL ERADICATION OF CITRUS CANCKER IN A CITRUS-PRODUCING FARM IN SÃO PAULO STATE, BRAZIL. **Journal of Plant Pathology**, p. 8, 2014.

BELLANGER, N., DEREPPER, A., KOEBNIK, R. 2022. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats in *Xanthomonas citri*—witnesses to a global expansion of a bacterial pathogen over time. **Microorganisms.** 10:1715.

BRAGA, W. DE S., CUNHA, R. W. S., SUASSUNA, N. D., COUTINHO, W. M. 2016. Prevalence of race 18 of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* on cotton in Brazil. **Tropical Plant Pathology.** 41:128–131.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 107–133, 1 mar. 2010.

CARVER, T. et al. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464–469, 15 fev. 2012.

CATARA, VITTORIA, JAIME CUBERO, JOËL F. POTHIER, ERAN BOSIS, CLAUDE BRAGARD, EDYTA ĐERMIĆ, MARIA C. HOLEVA, et al. “Trends in Molecular Diagnosis and Diversity Studies for Phytosanitary Regulated *Xanthomonas*.” *Microorganisms* 9, no. 4 (2021): 862. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040862>.

CHAN, J. W. Y. F.; GOODWIN, P. H. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by PFGE and RFLP. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, n. 9, p. 867–878, 1 dez. 1999.

CONSTANTIN, E. C.; CLEENWERCK, I.; MAES, M.; BAEYEN, S.; VAN MALDERGHEM, C.; DE VOS, P.; COTTYN, B. G. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, v. 65, n. 5, p. 792–806, 5 out. 2015.

- DANHORN, THOMAS, CLAY FUQUA. "Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria." *Annual Review of Microbiology* 61, no. 1 (2007): 401–22. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>.
- DOW, J. M.; CROSSMAN, L.; FINDLAY, K.; HE, Y.-Q.; FENG, J.-X.; TANG, J. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell–cell signaling and is required for full virulence to plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 19, p. 10995–11000, 16 set. 2003.
- DUNGER, G., GUZZO, C. R., and RADE, M. O., JONES, J. B., FARAH, C. S. 2014. *Xanthomonas Citri* subsp. *citri* type IV pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**. 27:1132–1147.
- ELASSBLI, H., ABDELRAHEEM, A., ZHU, Y., TENG, Z., SANOGO, S., WHEELER, T. A., et al. 2021. Evaluation and analysis of commercial cultivars and elite breeding lines for resistance to the bacterial blight pathogen race 18 in Cotton. **Euphytica**. 217.
- FALAH CHARKHABI, N. et al. Complete Genome Sequencing and Targeted Mutagenesis Reveal Virulence Contributions of Tal2 and Tal4b of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* ICMP11055 in Bacterial Leaf Streak of Wheat. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01488/full>>. Acesso em: 8 jan. 2021.
- FELIPE, V., ROMERO, A. M., MONTECCHIA, M. S., VOJNOV, A. A., BIANCO, M. I., YARYURA, P. M. 2018. *Xanthomonas vesicatoria* virulence factors involved in early stages of bacterial spot development in tomato. **Plant Pathology**. 67:1936–1943.
- FERREIRA, M. A. S. V.; BONNEAU, S.; BRIAND, M.; CESBRON, S.; PORTIER, P.; DARRASSE, A.; GAMA, M. A. S.; BARBOSA, M. A. G.; MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B.; JACQUES, M. *Xanthomonas citri* pv. *viticola* Affecting Grapevine in Brazil: Emergence of a Successful Monomorphic Pathogen. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 10, 18 abr. 2019.
- FUQUA, W. C., WINANS, S. C., GREENBERG, E. P. 1994. Quorum sensing in bacteria: The luxR-luxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**. 176:269–275.
- FURTADO, L. L., REGO-MACHADO, C. DE, MARIN-RAMIREZ, G., FREITAS, N. C., MOLINARI, H. B., SANTIAGO, T. R. 2021. CRISPR/Cas: Do Sistema Imune de Procaríotos ao controle de Doenças de Plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 27:7–31.
- GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Epidemiology and Control of Mango Bacterial Black Spot. **Plant Disease**, v. 85, n. 9, p. 928–935, 1 set. 2001.
- GAMA, M. A. S. et al. Polyphasic Characterization of Pigmented Strains of *Xanthomonas* Pathogenic to Cashew Trees. **Plant Disease**, v. 95, n. 7, p. 793–802, 15 mar. 2011.
- GAMA, M. A. S. et al. Taxonomic Repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and Emendation of the Description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to Include Pigmented Isolates Pathogenic to Cashew Plant. **Phytopathology**, v. 108, n. 10, p. 1143–1153, 24 abr. 2018.
- GONÇALVES, E R, Y B ROSATO. "Genotypic Characterization of *Xanthomonas* Strains Isolated from Passion Fruit Plants (*Passiflora* Spp.) and Their Relatedness to

Different *Xanthomonas* Species.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, no. 2 (2000): 811–21. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-811>.

GOTO, L. S. et al. Structural and Functional Characterization of the from *Xanthomonas citri* Subsp. *Citri*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 12, p. 1658–1666, 1 dez. 2016.

GUERRA, M. L., MALAFAIA, C. B., MACEDO, A. J., SILVA, M. V., MARIANO, R. L., SOUZA, E. B. 2017. Biofilm formation by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* affected by abiotic surfaces and Culture Media. **Tropical Plant Pathology**. 43:146–151.

GUREVICH, A. et al. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 15 abr. 2013.

HONGER, J. O., OSABUTEY, S., NYAKU, S. T., LAMBON, J. B. 2021. Molecular characterization, pathogenicity and copper sensitivity of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of mango bacterial black spot disease in Ghana. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. 54:1703–1721.

JACQUES, M.-A. et al. Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 54, n. 1, p. 163–187, 2016.

JANISSEN, R., MURILLO, D. M., NIZA, B., SAHOO, P. K., NOBREGA, M. M., CESAR, C. L., et al. 2015. Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. **Scientific Reports**. 5.

JEONG, K., MUÑOZ-BODNAR, A., ARIAS ROJAS, N., POULIN, L., RODRIGUEZ-R, L. M., GAGNEVIN, L., et al. 2019. CRISPR elements provide a new framework for the genealogy of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri*. **BMC Genomics**. 20.

KASTELEIN, P. et al. Spread of *Xanthomonas fragariae* in Strawberry Fields by Machinery. **EPPO Bulletin**, v. 48, n. 3, p. 569–577, 2018.

KESHKEIH, R. A., ABU-GHORRAH, M., JALLOUL, A. 2019. Exopolysaccharides from *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum* induce resistance in cotton against bacterial blight. **BioTechnologia**. 100:101–109.

KHAN, A.; SINGH, S.; SINGH, V. K. Bioinformatics in Plant Pathology. In: SINGH, K. P.; JAHAGIRDAR, S.; SARMA, B. K. (Ed.). **Emerging Trends in Plant Pathology**. Singapore: Springer, 2021. p. 725–844.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial Adhesins: Function and Structure. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 290, n. 1, p. 27–35, mar. 2000.

LI, J., WANG, N. 2014. Foliar application of biofilm formation–inhibiting compounds enhances control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Phytopathology®**. 104:134–142.

LI, L. et al. The Importance of the Viable but Non-Culturable State in Human Bacterial Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00258/full>>. Acesso em: 20 jun. 2019.

LI, R., WANG, X., WU, L., HUANG, L., QIN, Q., YAO, J., ET AL. 2020. *Xanthomonas campestris* sensor kinase hpas co-opts the orphan response regulator vemr to form a

branched two-component system that regulates motility. **Molecular Plant Pathology**. 21:360–375.

LI, Y., YU, Q. 2020. Role of the lipoprotein VACJ/mlaa in the physiology and virulence of the plant pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 112:101546.

LIAO, J.-X., LI, K.-H., WANG, J.-P., DENG, J.-R., LIU, Q.-G., CHANG, C.-Q. 2019. RNA-seq analysis provides insights into cold stress responses of *Xanthomonas citri* pv. *citri*. **BMC Genomics**. 20.

LOPES, J.M.S. Importância econômica do citros no brasil. **Revista Científica Eletrônica De Agronomia**. Garça, Vol. único, p. 1 – 3, 2011.

LUCENA, L. P. **Caracterização de células viáveis e não cultiváveis em *Xanthomonas citri* pv. *anacardii***. 2019. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

LUCENA, L. P., BENKO-ISEPPON, A. M., BRENIG, B., AZEVEDO, V., ABURJAILE, F., SOUZA, E. B., et al. 2023. Draft genome sequence of seven pigmented strains of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, the causal agent of cashew angular spot. **Phytopathology®**. 113:1360–1364.

MANSFIELD, J. et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 6, p. 614–629, 1 ago. 2012.

Maphosa, S., Moleleki, L. N., Motaung, T. E. 2023. Bacterial secretion system functions: Evidence of interactions and downstream implications. **Microbiology**. 169.

MELANSON, R. A. et al. Identification of new regulatory genes involved in the pathogenic functions of the rice-pathogenic bacterium *Burkholderia glumae*. **Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 266–279, 2017.

MELLO, M. R. de. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2018**, 2019.

MENDONÇA, L. B. P.; ZAMBOLIM, L.; BADEL, J. L. Bacterial Citrus Diseases: Major Threats and Recent Progress. **Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access**, v. Volume 5, n. Issue 4, 18 out. 2017. Disponível em: <<http://medcraveonline.com/JBMOA/JBMOA-05-00143.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

MIJATOVIĆ, J., SEVERNS, P. M., KEMERAIT, R. C., WALCOTT, R. R., KVITKO, B. H. 2021. Patterns of seed-to-seedling transmission of *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*, the causal agent of cotton bacterial blight. **Phytopathology®**. 111:2176–2184.

MINA, I. R., JARA, N. P., CRIOLLO, J. E., CASTILLO, J. A. 2019. The critical role of biofilms in bacterial vascular plant pathogenesis. **Plant Pathology**. 68:1439–1447.

MUNHOZ, C. F., B. WEISS, L. R. HANAI, M. I. ZUCCHI, M. H. FUNGARO, A. L. OLIVEIRA, C. B. MONTEIRO-VITORELLO, M. L. VIEIRA. “Genetic Diversity and a PCR-Based Method for *Xanthomonas Axonopodis* Detection in Passion Fruit.” **Phytopathology®** 101, no. 4 (2011): 416–24. <https://doi.org/10.1094/phyto-06-10-0169>.

NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. de L. R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 301–307, fev. 2004.

P. SABUQUILLO; CUBERO, J. Biofilm Formation in *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: Structure and Development. **Agronomy**, v. 11, n. 3, p. 546–546, 13 mar. 2021.

- PEIXOTO, A. R. et al. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 161–164, abr. 2007.
- PRUVOST, O. et al. CHAPTER 21: The Dynamic World of the Genus *Xanthomonas*. In: HOWARD F. SCHWARTZ et al. (Ed.). **Virulence Mechanisms of Plant-Pathogenic Bacteria**. Bacteriology. [s.l.] The American Phytopathological Society, 2016. p. 381–418.
- PRUVOST, O., BOYER, C., GRYGIEL, P., BOYER, K., VERNIERE, C., GAGNEVIN, L., et al. 2014. First report of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on *mangifera indica* in ivory coast. **Plant Disease**. 98:1740–1740.
- PRUVOST, O., SVELON, C., BOYER, C., CHIROLEU, F., GAGNEVIN, L., JACQUES, M.-A. 2009. Populations of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* from asymptomatic mango leaves are primarily endophytic. **Microbial Ecology**. 58:170–178.
- QI, Y.-H., HUANG, L., LIU, G.-F., LENG, M., LU, G.-T. 2020. Pilg and pilh antagonistically control flagellum-dependent and pili-dependent motility in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **BMC Microbiology**. 20.
- QIAN, W. et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**, v. 15, n. 6, p. 757–767, jun. 2005.
- RADEMAKER, W.; LOUWS, F. J.; SCHULTZ, M. G.; ROSSBACH, U.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; DE, J. A Comprehensive Species to Strain Taxonomic Framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 95, n. 9, p. 1098–1111, 1 set. 2005.
- SADDLER, G. S.; BRADBURY, J. F. *Xanthomonadales* ord. nov. In: BRENNER, D. J. et al. (Ed.). **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria**. Boston, MA: Springer US, 2005. p. 63–122.
- SENA-VÉLEZ, M., REDONDO, C., GELL, I., FERRAGUD, E., JOHNSON, E., GRAHAM, J. H., et al. 2014. Biofilm Formation and motility of xanthomonas strains with different citrus host range. **Plant Pathology**. 64:767–775.
- SHAFIEI, S. N., AHMAD, K., IKHSAN, N. F., ISMAIL, S. I., SIJAM, K. 2021. Suppression of *xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* biofilm formation by *Acacia mangium* methanol leaf extract. **Brazilian Journal of Biology**. 81:11–17.
- THAPA, S.; BABADOOST, M. Effectiveness of Chemical Compounds and Biocontrol Agents for Management of Bacterial Spot of Pumpkin Caused by *Xanthomonas Cucurbitae*. **Plant Health Progress**, v. 17, n. 2, p. 106–113, 1 jan. 2016.
- TOSTES, G. de O. et al. Detection and Cellular Localization of *Xanthomonas Campestris* Pv. *viticola* in Seeds of Commercial “Red Globe” Grapes. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 2, p. 134–140, abr. 2014.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 3, p. 472–489, 1 jul. 1995.
- VENIERAKI, A., TSALGATIDOU, P. CH., GEORGAKOPOULOS, D. G., DIMOU, M., KATINAKIS, P. 2016. Swarming motility in plant-associated bacteria. **Hellenic Plant Protection Journal**. 9:16–27.
- WANG, X.-Q., ALLEN, T. W., WANG, H., PETERSON, D. G., NICHOLS, R. L., LIU, A., et al. 2019. Development of a qPCR protocol to detect the cotton bacterial blight

pathogen, *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*, from cotton leaves and seeds. **Plant Disease**. 103:422–429.

WHEELER, T. A., HARRIS, T., BART, R. S., ISAKEIT, T., WOODWARD, J., ALLEN, T. W., et al. 2022. Response of *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum* isolates to cotton differing in susceptibility to the bacterium and their predicted type III effectors. **Plant Health Progress**. 23:40–44.

YOUNG, J. M. et al. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 21, n. 1, p. 153–177, 1 fev. 1978.

Zimaro, T., Thomas, L., Marondedze, C., Sgro, G. G., Garofalo, C. G., Ficarra, F. A., et al. 2014. The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* biofilm formation. **BMC Microbiology**. 14.

ZOMBRÉ, C. et al. First Report of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* Causing Mango Bacterial Canker on *Mangifera indica* in Togo. **Plant Disease**, v. 101, n. 3, p. 503–503, 24 out. 2016.

CAPÍTULO II

Genomic sequencing of *Xanthomonas citri* strains that cause diseases in tropical fruit and cotton plants

Genetics and Molecular Biology

Genomic sequencing of *Xanthomonas citri* strains that cause diseases in tropical fruit and cotton plants

Lucas Pontes de Lucena¹, Juan Carlos Ariute², Ana Maria Benko-Iseppon², Bertram Brenig³, Vasco Azevedo⁴, Flávia Figueira Aburjaile⁶, Elineide Barbosa de Souza⁵, Marco Aurélio Siqueira da Gama¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Departamento de Agronomia, Recife, PE, Brazil

²Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Departamento de Genética, Recife, PE, Brazil

³University Göttingen, Institute of Veterinary Medicine, Göttingen, Germany

⁴Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Genetics, Ecology and Evolution Department, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Departamento de Biologia, Recife, PE, Brazil

⁶Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Preventive Veterinary Medicine Department, Veterinary School, Belo Horizonte, MG, Brazil

Abstract

Xanthomonas citri is a phytopathogenic species with a wide host range. Among the main pathovars belonging to this species, we can highlight *X. citri* pv. *citri*, which causes citrus canker; *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, which causes the bacterial canker of the mango tree; *X. citri* pv. *viticola*, the causal agent of grapevine canker; and *X. citri* pv. *malvacearum*, responsible for the bacterial blight of cotton plants. In this work, 32 genomes belonging to these four pathovars were sequenced, 2 of which were from *X. citri* pv. *citri*, 1 from *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, 13 from *X. citri* pv. *viticola*, and 16 from *X. citri* pv. *malvacearum*. After sequencing, the genomic characteristics of the strains were analyzed, and comparative analyses were carried out in relation to the type and pathotype strains of the species *X. citri*. The genome size of these strains varied between 4,978,419 bp and 5,256,019 bp, and the N50 value varied between 67,322 bp and 727,867 bp. The observed GC content varied between 64.32% and 64.79%. All strains presented values greater than 77.3% of dDDH and 96.1% of ANIm when compared to each other and exceeded 93% of dDDH and 99% of ANI when compared in relation to the respective pathotype strains. Regarding orthologous genes, 1,298 core genes were observed. In this way, the genomes sequenced in this study will allow us to understand the biology of these organisms, enabling the development of more effective management strategies and the establishment of more precise and sustainable control measures, allowing the prevention of disease outbreaks caused by these bacteria.

Keywords: Plant pathogenic bacteria; *Citrus* spp; *Mangiferae indicae*; *Vitis vinifera*; *Gossypium* spp.

Xanthomonas citri has a wide range of hosts, being present on all inhabited continents its occurrence is highlighted as one of the main biotic factors capable of limiting the economic return of several plant species (Shabaz et al. 2023).

Among the main diseases caused by strains of *X. citri*, citrus canker, mango bacterial canker, cotton bacterial blight, and vine bacterial canker can be highlighted.

Citrus canker is caused by *X. citri* pv. *citri*, one of the main diseases of citrus crops. The disease has already been identified in several growing regions. The symptoms caused by the pathogen begin with small yellowish spots that become larger and protrude, giving the appearance of canker. These symptoms can be observed on leaves, branches, and fruits (Shahbaz et al. 2023). Mango bacterial canker is caused by *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, the main symptoms of the disease are necrotic leaf spots restricted by the veins, in some cases surrounded by a yellowish halo. The bacteria is also capable of infecting mango fruits, which, under high severities, can produce infectious exudation and cause premature fall (Zombré et al. 2015). Bacterial blight of cotton is caused by the bacteria *X. citri* pv. *malvacearum*. The initial symptoms of the disease are small, waterlogged leaf spots, which evolve into angular necrotic spots restricted by the veins. The bacteria can also cause lesions on the veins of the leaves as the disease progresses. Lesions tend to darken, resulting in a burning appearance. Necroses can also be observed in cotton apples (Wang et al. 2019). Grapevine bacterial canker is caused by *X. citri* pv. *viticola*, causing necrotic spots on the leaves, branches, veins, and petioles; symptoms include dark spots that can evolve into fissures, which induce the characteristic of canker. Symptoms can be observed on the berries, which also show dark spots (Beriam 2023).

Initially, the pathovars *X. citri* pv. *citri*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, *X. citri* pv. *malvacearum* and *X. citri* pv. *viticola* were classified as *X. campestris* pathovars. However, DNA hybridization analyzes reclassified these strains as belonging to the species *X. axonopodis* (Vauterin et al. 1995). Subsequent studies, using ERIC, REP and BOX-A1R-based repetitive extragenic palindromic-PCR techniques, grouped these bacteria into two distinct clusters (9.5 and 9.6) and reclassified them as part of the species *X. citri* (Rademaker et al, 2005; Constantin et al, 2016). In this context, the sequencing of strains of *X. citri* species is an important tool for researchers providing important resources for understanding the ecology, etiology, epidemiology, and management of diseases caused by this species (Lucena et al. 2023).

Strains of *Xanthomonas citri* (Supplementary Table 1) were obtained from the Rosa Mariano Culture Collection from the Phytobacteriology Laboratory (LAFIBAC) of Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), which were previously isolated from leaves of the respective hosts and cultivated in NYDA medium (20g of agar, 10g of dextrose, 5g of peptone, 5g of yeast extract, 3g of meat extract, and one liter of sterilized distilled water), being subsequently incubated in a BOD-type chamber at 29° C for 36 h. After this period, the isolated colonies were selected for DNA extraction with the aid of the MiniPrep bacterial DNA extraction kit (Axygen Biosciences, Tewksbury, MA) according to the manufacturer's instructions. The construction of the libraries was carried out according to the manufacturer's recommendations, and genome sequencing was carried out using the Illumina HiSeq 2500 platform (Illumina, San Diego, CA),

constructing paired-end libraries with 150bp reads. The quality of the reads was then evaluated using FastQC software (Andrews, 2010). Adapters and low-quality reads were removed using Trimmomatic v. 0.32 (Bolger et al, 2014), and then the genomes were assembled de novo with the help of SPAdes (Bankevich et al, 2012). Assembly data were obtained using QUAST (Gurevich et al., 2013) and automatic annotation of the genomes was performed using Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) (Overbeek et al., 2013). The completeness of the assembled genomes was assessed using CheckM software (Parks et al. 2015), and the presence of plasmids was assessed using PlasmidFinder (Carattoli et al. 2014). The data obtained in these analyses were used together with data from pathotype strains of the species *X. citri* obtained from the GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). The average nucleotide identity based on the Mummer aligner (ANIm) was calculated using pyani v.0.2.11 (Pritchard et al., 2015), and DNA-DNA hybridization was performed using the GGDC platform (Meier-Kolthoff et al., 2015). al., 2022), orthologous genes were obtained using the Roary pipeline (Page et al. 2015). These genes were aligned using Mafft 7.487 (Katoh and Standley, 2013), and a maximum likelihood tree was constructed using IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016). Analyses of CRISPR sequences were carried out using CRISPRminer (Zhang et al. 2018). Effector proteins of types III and IV were predicted using the programs T3SEPP (Hui et al. 2020) and T4Sepre (Wang et al. 2014) with the default parameters, and the predicted proteins were evaluated using BLASTP from the GenBank database.

Size of the *X. citri* genomes analyzed in this study varied from 4,978,419 bp (*X. citri* pv. *malvacearum*, strain CRMXCM242) to 5,256,019 bp (*X. citri* pv. *viticola*, strain CCRMXCV214). The *X. citri* pv. *viticola*, strain CCRMXCV13 presented the highest number of coding sequences, with 4903 sequences, while the *X. citri* pv. *malvacearum*, strain CRMXCM424.1 presented the lowest value, with 4650. The N50 value varied between 727867 bp in the *X. citri* pv. *viticola* strain CCRMXCV154 and 67322 bp in *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, strain CCRM1M. The size of the largest contig observed varied between 1527958 bp in *X. citri* pv. *viticola*, CCRMXCV13 and 167874 bp in *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, strain CCRM1M. The highest amount of GC content was observed in *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, strain CCRM1M, with 64.79%, while the lowest value obtained was 64.32%, in *X. citri* pv. *viticola* CCRMXCV13. Regarding the quantity of RNAs, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, strain CCRM1M presented the lowest quantity, with 54 RNAs; the strains of *X. citri* pv. *citri* CCRM1Ci and CCRM6Ci presented 56 RNAs, the highest value observed among all strains evaluated in this study, while the rest of the strains presented 55 RNAs (Suppl Table S1.). No plasmids were detected in the genomes sequenced in this work. All strains were 100% completed. The ANI analyses demonstrated values above 96.1% when comparing all the strains analyzed, and the values observed in the DDH analyses were all higher than 77.3% (Figure 1). When ANI and dDDH values were compared in relation to the pathotype strains, the strains of *X. citri* pv. *citri* sequenced in this study presented values of 99.9% and 99.2%; the strain of *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* presented 99.9% and 97.2%; the strains of *X. citri* pv.

viticola presented 99.9% and above 99%; and strains of the *X. citri* pv. *malvacearum* presented 99.5% and 99.9% and DDH between 93.6% and 96.9% in relation to the pathotype strain. Regarding orthologous genes, out of a total of 13,647 genes, 1,298 core genes, 1,691 soft core genes, 2,886 shell genes, and 7,772 cloud genes were detected. CRISPR sequences were detected in all analyzed strains, and cas proteins information are presented in (Figure 2).

Considering that all ANI values were greater than 95% and DDH exceeded 70% for all strains evaluated, it can be confirmed that the strains sequenced in this work belong to the species *X. citri* according to previously established parameters (Chung et al. 2018, Goris et al. 2007). Maximum likelihood tree analysis divided the *X. citri* strains into two phylogenetic groups, as observed in previous studies (Lucena et al. 2023, Gama et al. 2018), the strains sequenced in this study were grouped with the pathotype strains of the respective pathovars with a 100% bootstrap. The genes predicted to be related to the types III and IV secretion systems demonstrated the presence of genes from the Xop family (*XopX*, *XopA*, *XopV*), in accordance with previous studies on isolates of *X. citri* pv. *citri* and *X. citri* pv. *anacardii* (White et al. 2009; Lucena et al. 2023). The presence of the cas3-type protein observed in strains of *X. citri* pv. *citri* CCRM1Ci and CCRM6Ci indicate that both belong to CRISPR-cas locus type I (Makarova et al. 2015). DEDDh and Ding were the main domains associated with CRISPR. Among the strains evaluated, no domain related to CRISPR was found only in strains CCRMXCV124, CCRMXCV154, CCRMXCV214 and CCRMXCV230 of *X. citri* pv. *viticola*.

Therefore, the data made available in these studies provide resources capable of contributing to the knowledge of the biology, genomics, and pathology of *X. citri* pv. *citri*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, *X. citri* pv. *malvacearum* and *X. citri* pv. *viticola*, ensuring useful information for the development of management strategies for diseases caused by these organisms.

References

- Andrews S (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics. DOI: citeulike-articleid:11583827.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD et al. (2012) Spades: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19:455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- Beriam LOS (2023) Doenças bacterianas da videira. In: Bueno CJ (ed) Boletim Técnico Doenças e pragas em videiras. Instituto Biológico. Instituto Biológico, São Paulo, SP, pp 42–60
- Bolger AM, Lohse M and Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170

178 Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L,
179 Møller Aarestrup F and Hasman H (2014) in silico detection and typing of
180 plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing.
181 Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58:3895–3903. doi:
182 10.1128/aac.02412-14

183 Chung M, Munro JB, Tettelin H and Dunning Hotopp JC (2018) Using core
184 genome alignments to assign bacterial species. mSystems. doi:
185 10.1128/msystems.00236-18

186 Constantin EC, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, Van Malderghem C, De Vos
187 P and Cottyn B (2015) Genetic characterization of strains named as
188 *xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of
189 the *X. axonopodis* species complex. Plant Pathology 65:792–806. doi:
190 10.1111/ppa.12461

191 Gama MAS, Mariano RLR, Silva Júnior WJ, Farias AR, Barbosa MA, Ferreira
192 MA, Costa Júnior CR, Santos LA and Souza EB (2018) Taxonomic repositioning
193 of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (nayudu 1972) dye 1978 as
194 *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (nayudu 1972) dye 1978 comb. nov. and
195 emendation of the description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to include
196 pigmented isolates pathogenic to cashew plant. Phytopathology® 108:1143–
197 1153. doi: 10.1094/phyto-02-18-0037-r

198 Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P and Tiedje
199 JM (2007) DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-
200 genome sequence similarities. International Journal of Systematic and
201 Evolutionary Microbiology 57:81–91. doi: 10.1099/ijs.0.64483-0

202 Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N and Tesler G (2013) Quast: Quality
203 Assessment Tool for Genome Assemblies. Bioinformatics 29:1072–1075. doi:
204 10.1093/bioinformatics/btt086

205 Hui X, Chen Z, Lin M, Zhang J, Hu Y, Zeng Y, Cheng X, Ou-Yang L, Sun M, White
206 AP et al. (2020) T3SEPP: An integrated prediction pipeline for bacterial type III
207 secreted effectors. mSystems. doi: 10.1128/msystems.00288-20

208 Katoh K and Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software
209 version 7: Improvements in performance and usability. Molecular Biology and
210 Evolution 30:772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010

211 Lucena LP, Benko-Iseppon AM, Brenig B, Azevedo V, Aburjaile F, Souza EB and
212 Gama MA (2023) Draft genome sequence of seven pigmented strains of
213 *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, the causal agent of cashew angular spot.
214 Phytopathology® 113:1360–1364. doi: 10.1094/phyto-08-22-0279-a

215 Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ,
216 Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH et al. (2015) An updated
217 evolutionary classification of CRISPR–Cas Systems. Nature Reviews
218 Microbiology 13:722–736. doi: 10.1038/nrmicro3569

219 Meier-Kolthoff JP, Carbasse JS, Peinado-Olarte RL and Göker M (2021) Tygs
 220 and LPSN: A database tandem for fast and reliable genome-based classification
 221 and Nomenclature of Prokaryotes. *Nucleic Acids Research*. doi:
 222 10.1093/nar/gkab902

223 Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA,
 224 Gerdes S, Parrello B, Shukla M et al. (2013) The seed and the rapid annotation
 225 of microbial genomes using subsystems technology (RAST). *Nucleic Acids*
 226 *Research*. doi: 10.1093/nar/gkt1226

227 Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, Fookes M,
 228 Falush D, Keane JA and Parkhill J (2015) Roary: Rapid large-scale prokaryote
 229 Pan Genome Analysis. *Bioinformatics* 31:3691–3693. doi:
 230 10.1093/bioinformatics/btv421

231 Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P and Tyson GW (2015)
 232 Checkm: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates,
 233 single cells, and Metagenomes. *Genome Research* 25:1043–1055. doi:
 234 10.1101/gr.186072.114

235 Pritchard L, Glover RH, Humphris S, Elphinstone JG and Toth IK (2016)
 236 Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting
 237 enterobacterial plant pathogens. *Analytical Methods* 8:12–24. doi:
 238 10.1039/c5ay02550h

239 Rademaker JL, Louws FJ, Schultz MH, Rossbach U, Vauterin L, Swings J and
 240 de Bruijn FJ (2005) A comprehensive species to strain taxonomic framework for
 241 *xanthomonas*. *Phytopathology®* 95:1098–1111. doi: 10.1094/phyto-95-1098

242 Shahbaz E, Ali M, Shafiq M, Atiq M, Hussain M, Balal RM, Sarkhosh A, Alferez
 243 F, Sadiq S and Shahid MA (2022) Citrus canker pathogen, its mechanism of
 244 infection, eradication, and impacts. *Plants* 12:123. doi: 10.3390/plants12010123

245 Trifinopoulos J, Nguyen L-T, von Haeseler A and Minh BQ (2016) W-IQ-tree: A
 246 fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids*
 247 *Research*. doi: 10.1093/nar/gkw256

248 Vauterin L, Hoste B, Kersters K and Swings J (1995) Reclassification of
 249 *xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:472–489. doi:
 250 10.1099/00207713-45-3-472

251 Wang X-Q, Allen TW, Wang H, Peterson DG, Nichols RL, Liu A, Li X-D, Deng
 252 P, Jia D and Lu S-E (2019) Development of a qPCR protocol to detect the
 253 cotton bacterial blight pathogen, *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*, from
 254 cotton leaves and seeds. *Plant Disease* 103:422–429. doi: 10.1094/pdis-07-18-
 255 1150-re

256 Wang Y, Wei X, Bao H and Liu S-L (2014) Prediction of bacterial type IV secreted
 257 effectors by C-terminal features. *BMC Genomics* 15:50. doi: 10.1186/1471-2164-
 258 15-50

259 White FF, Potnis N, Jones JB and Koebnik R (2009) The type III effectors of
 260 *Xanthomonas*. Molecular Plant Pathology 10:749–766. doi: 10.1111/j.1364-
 261 3703.2009.00590.x

262 Zhang F, Zhao S, Ren C, Zhu Y, Zhou H, Lai Y, Zhou F, Jia Y, Zheng K and
 263 Huang Z (2018) Crisprminer is a knowledge base for exploring CRISPR-cas
 264 systems in microbe and phage interactions. Communications Biology. doi:
 265 10.1038/s42003-018-0184-6

266 Zombré C, Sankara P, Ouédraogo SL, Wonni I, Pruvost O, Boyer C, Vernière C,
 267 Adandonon A, Vayssières JF and Ahohuendo BC (2015) First report of
 268 *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on
 269 *mangifera indica* L. in Benin. Plant Disease 99:1854–1854. doi: 10.1094/pdis-04-
 270 15-0392-pdn

271

Fig. 1. A, Heatmap representing the percentage of identity (average nucleotide identity based on the Mummer aligner [ANIm]) and digital DNA-DNA hybridization (dDDH) between sequenced strains of pathovars of *X. citri*. The upper triangle shows the ANIm values, and the lower triangle shows the dDDH values. **B**, Maximum-likelihood phylogenetic tree based on core genes of sequenced strains of pathovars of *X. citri*. Numbers at nodes are bootstrap values (>50%) from 1,000 repetitions. The bar represents the expected number of substitutions per site. Superscripts following strain names: ^T=type strain of a species, and ^{PT}=pathotype strain of a pathovar

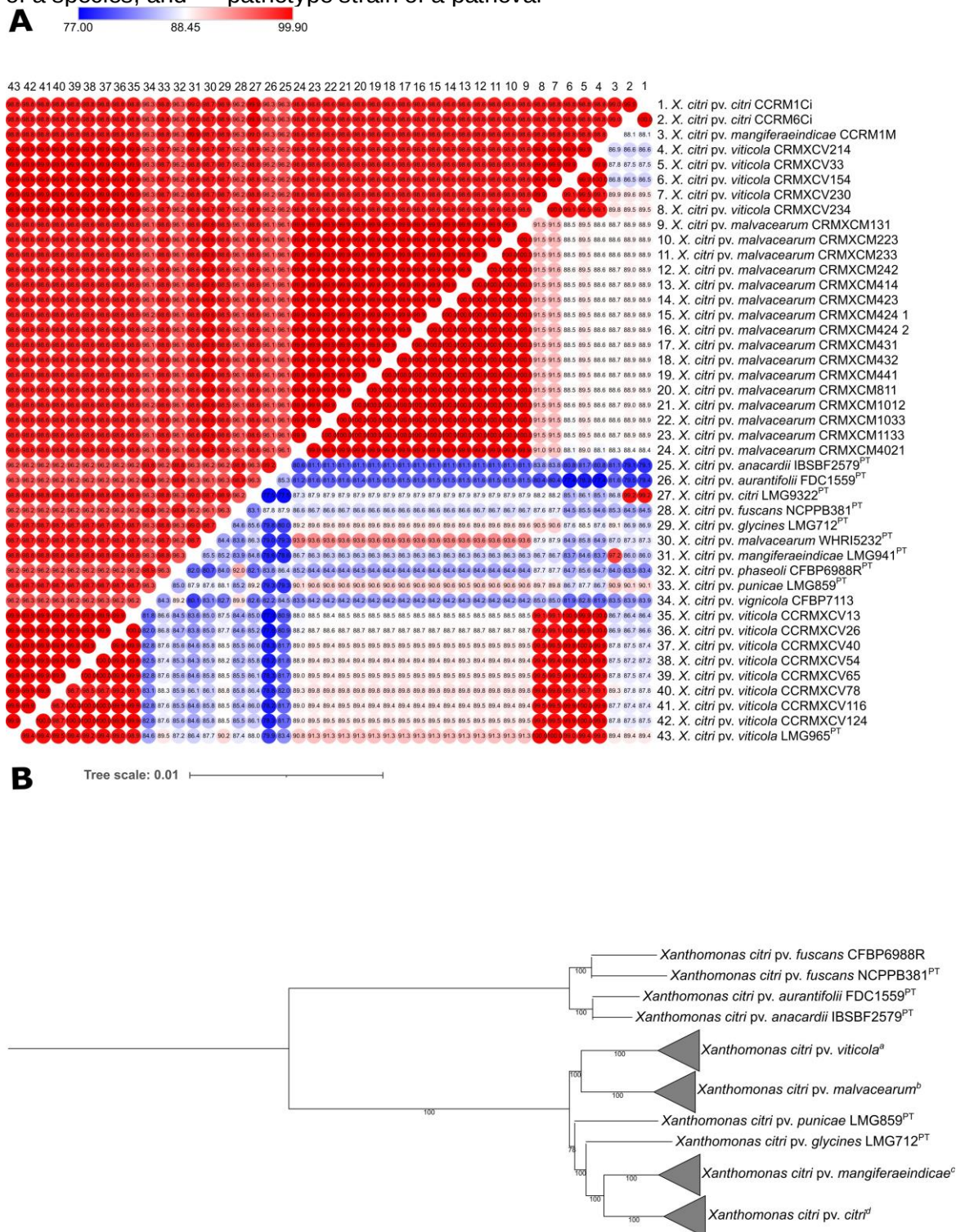
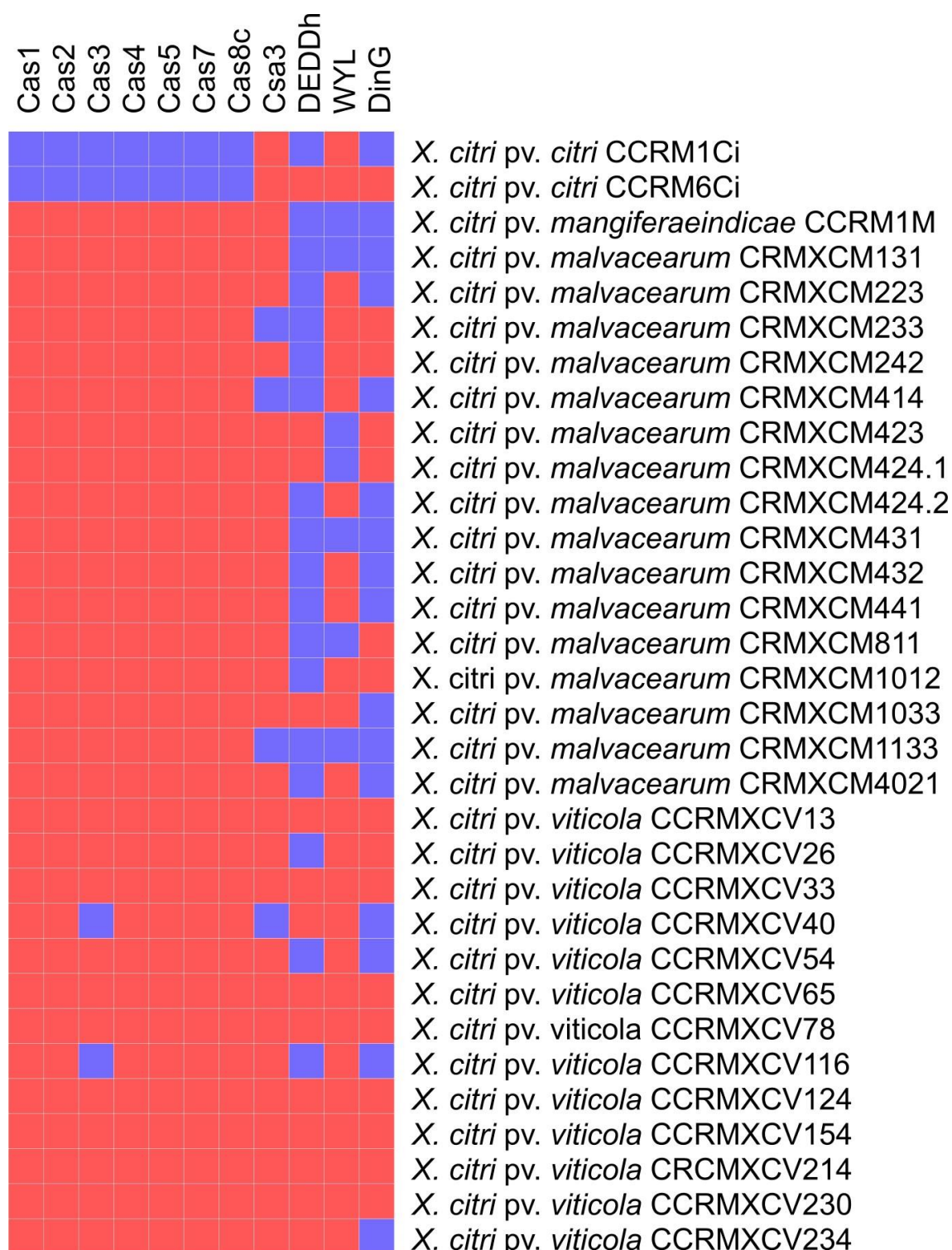


Figure 2. CRISPR data of *Xanthomonas citri* strains sequenced in this study.



Supplementary Table S1. Genome data of *Xanthomonas citri* strains sequenced in this study.

Species	Strain	Parameters						
		Genome length	GC content (%)	Number of coding sequences	Largest contig	N50	Number of RNAs	Number of contigs
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	CCRM1Ci	5197089	64.75	4821	527416	223493	56	71
	CCRM6Ci	5198055	64.76	4819	533654	223223	56	70
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	CCRM1M	5054542	64.79	4795	167874	67322	54	185
	CCRMXCV13	5263262	64.32	4903	1527958	697019	55	43
	CCRMXCV26	5250586	64.36	4888	1527929	510992	55	46
	CCRMXCV40	5202584	64.37	4859	1527914	571934	55	44
	CCRMXCV54	5209027	64.33	4874	1527930	510973	55	43
	CCRMXCV65	5202798	64.37	4847	1527973	697017	55	43
	CCRMXCV78	5076560	64.48	4669	1527802	510972	55	40
	CCRMXCV116	5201090	64.37	4853	1418535	600665	55	45
	CCRMXCV124	5202376	64.37	4841	1166299	379235	55	40
	CCRMXCV214	5256019	64.36	4888	1527844	697011	55	42
	CCRMXCV33	5201517	64.37	4838	1527746	696996	55	42
	CCRMXCV154	5255359	64.36	4883	1527888	727867	55	37
	CCRMXCV230	5074786	64.49	4683	1527848	696822	55	39
	CCRMXCV234	5077869	64.48	4679	1527857	727863	55	36
	CRMXCM131	4980656	64.7	4655	357903	134798	55	113
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>malvacearum</i>	CRMXCM223	4980613	64.7	4651	357903	134797	55	114
	CRMXCM233	4980954	64.7	4662	357903	134797	55	112
	CRMXCM242	4978419	64.7	4668	343067	134797	55	113
	CRMXCM414	4980208	64.7	4660	299076	118427	55	117
	CRMXCM423	4980083	64.7	4662	357890	134797	55	113
	CRMXCM424.1	4980246	64.7	4650	357890	134797	55	113
	CRMXCM424.2	4980238	64.7	4652	357890	134797	55	113

CRMXCM431	4980218	64.7	4655	357890	134797	55	115
CRMXCM432	4980767	64.7	4655	357890	134797	55	110
CRMXCM441	4980237	64.7	4662	357890	134795	55	113
CRMXCM811	4979176	64.7	4654	357890	134797	55	113
CRMXCM1012	4978593	64.7	4671	343067	134797	55	113
CRMXCM1033	4979964	64.7	4658	357903	134797	55	113
CRMXCM1133	4980110	64.7	4667	343073	134797	55	114
CRMXCM4021	5013614	64.68	4696	357896	134797	55	115

Supplementary Table S2. Type III and IV effector proteins predicted in the genomes of the strains of *Xanthomonas citri* pv. *citri*, *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae*, *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum* and *Xanthomonas citri* pv. *viticola* sequenced in this study.

Xanthomonascitripv.citriCCRM1C i		
Prot	Pred	Description
fig 6666666.1076482.peg.3350	T3S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076482.peg.1888	T3S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076482.peg.1015	T3S	4-hydroxyphenylacetate catabolism regulator HpaA
fig 6666666.1076482.peg.1022	T3S	HrpF/NolX family T3SS translocon protein
fig 6666666.1076482.peg.1077	T3S	cellulase family glycosylhydrolase
fig 6666666.1076482.peg.1084	T3S	Hypothetical Protein
fig 6666666.1076482.peg.1094	T3S	type III secretion system effector avirulence protein AvrBs2
fig 6666666.1076482.peg.1177	T3S	CPBP family intramembrane glutamic endopeptidase
fig 6666666.1076482.peg.1244	T3S	TonB-like protein
fig 6666666.1076482.peg.1344	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076482.peg.1404	T3S	Crp/Fnr family transcriptional regulator
fig 6666666.1076482.peg.3350	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076482.peg.1888	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076482.peg.488	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1076482.peg.4195	T4S	Hypothetical Protein
fig 6666666.1076482.peg.446	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076482.peg.2346	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1076482.peg.2529	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076482.peg.555	T4S	Helicase IV
fig 6666666.1076482.peg.3411	T4S	Hypothetical Protein
fig 6666666.1076482.peg.3805	T4S	DUF4329 domain-containing protein

Xanthomonascitripv.citriCCRM6 Ci		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076486.peg.3221	T3S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076486.peg.1551	T3S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076486.peg.1030	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076486.peg.1130	T3S	TonB-like protein
fig 6666666.1076486.peg.1149	T3S	Crp/Fnr family transcriptional regulator
fig 6666666.1076486.peg.1222	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076486.peg.1226	T3S	methyl-accepting chemotaxis protein
fig 6666666.1076486.peg.1256	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076486.peg.1257	T3S	SymE family type I addiction module toxin
fig 6666666.1076486.peg.1315	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076486.peg.3221	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076486.peg.1551	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076486.peg.2220	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1076486.peg.4149	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076486.peg.2178	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076486.peg.3083	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.1076486.peg.2334	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076486.peg.4651	T4S	Helicase IV
fig 6666666.1076486.peg.2	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076486.peg.3826	T4S	DUF4329 domain- containing protein

X. citri pv. mangiferaeindicae CCRM1M		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076488.peg.4734	T3S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076488.peg.539	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076488.peg.1100	T3S	protein adenyltransferase SelO family protein
fig 6666666.1076488.peg.1114	T3S	Crp/Fnr family transcriptional regulator
fig 6666666.1076488.peg.1182	T3S	Avirulence protein AvrBs3
fig 6666666.1076488.peg.1198	T3S	cellulase family glycosylhydrolase
fig 6666666.1076488.peg.1252	T3S	HrpF/NolX family T3SS translocon protein
fig 6666666.1076488.peg.1260	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076488.peg.1276	T3S	elicitor of hypersensitive response HpaG
fig 6666666.1076488.peg.1277	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076488.peg.4734	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076488.peg.539	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076488.peg.4199	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1076488.peg.371	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076488.peg.3751	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.1076488.peg.3102	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076488.peg.4794	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076488.peg.939	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076488.peg.2050	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B

X.citripv.malvacearumCRMXCM131		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076504.peg.1004	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076504.peg.1069	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076504.peg.1227	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076504.peg.1228	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076504.peg.1269	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076504.peg.1396	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076504.peg.1398	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076504.peg.1399	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076504.peg.1404	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076504.peg.1444	T3S	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
fig 6666666.1076504.peg.3861	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076504.peg.933	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076504.peg.3124	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076504.peg.74	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076504.peg.4305	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076504.peg.1152	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.1076504.peg.3172	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076504.peg.114	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076504.peg.2320	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076504.peg.32	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector

X.citripv.malvacearumCRMXCM2 23		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076509.peg.1010	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076509.peg.1075	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076509.peg.1223	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076509.peg.1265	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076509.peg.1266	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076509.peg.1401	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076509.peg.1403	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076509.peg.1404	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076509.peg.1409	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076509.peg.1449	T3S	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
fig 6666666.1076509.peg.3860	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076509.peg.939	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076509.peg.3078	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076509.peg.261	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076509.peg.4303	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076509.peg.1158	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1076509.peg.3168	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076509.peg.222	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076509.peg.2391	T4S	hypothetical protein

X.citripv.malvacearumCRMXCM233		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076510.peg.3841	T3S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076510.peg.1075	T3S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076510.peg.1098	T3S	DUF3426 domain-containing protein
fig 6666666.1076510.peg.1118	T3S	CD225/dispanin family protein
fig 6666666.1076510.peg.1146	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076510.peg.1200	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076510.peg.1369	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076510.peg.1370	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076510.peg.1411	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076510.peg.1456	T3S	TrmH family RNA methyltransferase
fig 6666666.1076510.peg.3841	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076510.peg.1075	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076510.peg.3130	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076510.peg.261	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076510.peg.1294	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.1076510.peg.3160	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076510.peg.221	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076510.peg.2369	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076510.peg.303	T4S	type III secretion system effector protein
fig 6666666.1076510.peg.964	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.1076510.peg.4287	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076510.peg.4481	T4S	hypothetical protein

X.citripv.malvacearumCRMXCM2 42		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076518.peg.1000	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076518.peg.1054	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076518.peg.1213	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076518.peg.1255	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076518.peg.1256	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076518.peg.1433	T3S	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
fig 6666666.1076518.peg.1473	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076518.peg.1478	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076518.peg.1479	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076518.peg.1481	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076518.peg.3878	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076518.peg.929	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076518.peg.3139	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076518.peg.246	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076518.peg.4318	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076518.peg.1164	T4S	methylosuccinate lyase
fig 6666666.1076518.peg.3169	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076518.peg.206	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076518.peg.2317	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076518.peg.289	T4S	type III secretion system effector protein

X.citripv.malvacearumCRMXCM4 14		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076517.peg.3861	T3S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076517.peg.885	T3S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076517.peg.1010	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076517.peg.1170	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076517.peg.1185	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076517.peg.1212	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076517.peg.1213	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076517.peg.1348	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076517.peg.1350	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076517.peg.1351	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076517.peg.3861	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076517.peg.885	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076517.peg.3075	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076517.peg.15	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076517.peg.1121	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.1076517.peg.3122	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076517.peg.55	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076517.peg.2279	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076517.peg.2426	T4S	type III secretion system effector protein
fig 6666666.1076517.peg.1301	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.1076517.peg.4283	T4S	hypothetical protein

X.citripv.malvacearumCRMXCM4 23		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076524.peg.1074	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076524.peg.1232	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076524.peg.1233	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076524.peg.1274	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076524.peg.1401	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076524.peg.1403	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076524.peg.1404	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076524.peg.1409	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076524.peg.1449	T3S	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
fig 6666666.1076524.peg.1667	T3S	class III extradiol ring-cleavage dioxygenase
fig 6666666.1076524.peg.3867	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076524.peg.971	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076524.peg.3130	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076524.peg.74	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076524.peg.1173	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.1076524.peg.3178	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076524.peg.114	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076524.peg.2327	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076524.peg.32	T4S	type III secretion system effector protein
fig 6666666.1076524.peg.1332	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.1076524.peg.4289	T4S	hypothetical protein

X.citripv.malvacearumCRM4 241		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076523.peg.1005	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076523.peg.1070	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076523.peg.1218	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076523.peg.1260	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076523.peg.1261	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076523.peg.1438	T3S	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
fig 6666666.1076523.peg.1478	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076523.peg.1483	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076523.peg.1484	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076523.peg.1486	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076523.peg.3856	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076523.peg.934	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076523.peg.3136	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076523.peg.74	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076523.peg.1169	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1076523.peg.3166	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076523.peg.114	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076523.peg.2386	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076523.peg.32	T4S	type III secretion system effector protein
fig 6666666.1076523.peg.1329	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B

X.citripv.malvacearumCRM4 242		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076533.peg.3863	T3S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076533.peg.935	T3S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076533.peg.1006	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076533.peg.1060	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076533.peg.1228	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076533.peg.1229	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076533.peg.1270	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076533.peg.1397	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076533.peg.1399	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076533.peg.1400	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076533.peg.3863	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076533.peg.935	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076533.peg.3119	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076533.peg.259	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076533.peg.1169	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.1076533.peg.3167	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076533.peg.220	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076533.peg.2321	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076533.peg.301	T4S	type III secretion system effector protein
fig 6666666.1076533.peg.1349	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.1076533.peg.4281	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076533.peg.2172	T4S	hypothetical protein

X.citripv.malvacearumCRMXCM4 31		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076534.peg.1012	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076534.peg.1076	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076534.peg.1234	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076534.peg.1235	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076534.peg.1276	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076534.peg.1441	T3S	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
fig 6666666.1076534.peg.1481	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076534.peg.1486	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076534.peg.1487	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076534.peg.1489	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076534.peg.3839	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076534.peg.941	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076534.peg.3082	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076534.peg.73	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076534.peg.1159	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.1076534.peg.3112	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076534.peg.113	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076534.peg.2390	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076534.peg.31	T4S	type III secretion system effector protein
fig 6666666.1076534.peg.1355	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B

X.citripv.malvacearumCRMXCM432		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076535.peg.1012	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076535.peg.1096	T3S	DUF3426 domain-containing protein
fig 6666666.1076535.peg.1116	T3S	CD225/dispanin family protein
fig 6666666.1076535.peg.1144	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076535.peg.1198	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076535.peg.1366	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076535.peg.1367	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076535.peg.1409	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076535.peg.1472	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076535.peg.1477	T3S	TrmH family RNA methyltransferase
fig 6666666.1076535.peg.3859	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076535.peg.1073	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076535.peg.3162	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076535.peg.74	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076535.peg.4300	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076535.peg.1292	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.1076535.peg.3210	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076535.peg.114	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076535.peg.2427	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076535.peg.32	T4S	type III secretion system effector protein

X.citripv.malvacearumCRMXCM4 41		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076537.peg.1074	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076537.peg.1222	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076537.peg.1263	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076537.peg.1264	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076537.peg.1401	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076537.peg.1403	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076537.peg.1404	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076537.peg.1409	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076537.peg.1449	T3S	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
fig 6666666.1076537.peg.1667	T3S	class III extradiol ring-cleavage dioxygenase
fig 6666666.1076537.peg.3867	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076537.peg.970	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076537.peg.3129	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076537.peg.74	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076537.peg.1157	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.1076537.peg.3177	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076537.peg.114	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076537.peg.2326	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076537.peg.32	T4S	type III secretion system effector protein
fig 6666666.1076537.peg.1332	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B

X.citripv.malvacearumCRM8 11		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076538.peg.1008	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076538.peg.1062	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076538.peg.1231	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076538.peg.1232	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076538.peg.1273	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076538.peg.1438	T3S	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
fig 6666666.1076538.peg.1478	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076538.peg.1483	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076538.peg.1484	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076538.peg.1486	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076538.peg.3838	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076538.peg.937	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076538.peg.3079	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076538.peg.260	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076538.peg.1172	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.1076538.peg.3109	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076538.peg.221	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076538.peg.2388	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076538.peg.302	T4S	type III secretion system effector protein
fig 6666666.1076538.peg.1352	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B

X.citripv.malvacearumCRMXC1012		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076539.peg.1062	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076539.peg.1221	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076539.peg.1222	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076539.peg.1264	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076539.peg.1391	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076539.peg.1393	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076539.peg.1394	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076539.peg.1399	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076539.peg.1439	T3S	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
fig 6666666.1076539.peg.1589	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076539.peg.3877	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076539.peg.925	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076539.peg.3141	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076539.peg.245	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076539.peg.1146	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1076539.peg.3171	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076539.peg.205	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076539.peg.2385	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076539.peg.288	T4S	type III secretion system effector protein
fig 6666666.1076539.peg.1322	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.1076539.peg.4299	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076539.peg.2169	T4S	hypothetical protein

X.citripv.malvacearumCRMXCM1033		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076540.peg.1009	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076540.peg.1074	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076540.peg.1232	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076540.peg.1233	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076540.peg.1274	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076540.peg.1400	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076540.peg.1402	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076540.peg.1403	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076540.peg.1408	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076540.peg.1448	T3S	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
fig 6666666.1076540.peg.3866	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076540.peg.938	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076540.peg.3125	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076540.peg.74	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076540.peg.1173	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1076540.peg.3173	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076540.peg.114	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076540.peg.2323	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076540.peg.32	T4S	type III secretion system effector protein
fig 6666666.1076540.peg.1353	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B

X.citripv.malvacearumCRMXC1133		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076541.peg.1050	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076541.peg.1209	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076541.peg.1251	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076541.peg.1252	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076541.peg.1389	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076541.peg.1391	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076541.peg.1392	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076541.peg.1397	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076541.peg.1437	T3S	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
fig 6666666.1076541.peg.1586	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076541.peg.3873	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076541.peg.925	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076541.peg.3116	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076541.peg.74	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076541.peg.1160	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1076541.peg.3164	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076541.peg.114	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076541.peg.2313	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076541.peg.32	T4S	type III secretion system effector protein
fig 6666666.1076541.peg.1320	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B

X.citripv.malvacearumCRMXCM4 021		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076542.peg.1010	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076542.peg.1065	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076542.peg.1234	T3S	glycosyltransferase
fig 6666666.1076542.peg.1235	T3S	GumJ protein
fig 6666666.1076542.peg.1275	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076542.peg.1399	T3S	FG-GAP repeat protein
fig 6666666.1076542.peg.1401	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076542.peg.1402	T3S	VirB4 family type IV secretion/conjugal transfer ATPase
fig 6666666.1076542.peg.1407	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076542.peg.1447	T3S	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
fig 6666666.1076542.peg.3886	T4S	head completion/stabilization protein
fig 6666666.1076542.peg.939	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076542.peg.3060	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076542.peg.76	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.1076542.peg.4347	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076542.peg.1175	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.1076542.peg.3108	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.1076542.peg.114	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076542.peg.2321	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076542.peg.33	T4S	type III secretion system effector protein

X.citripv.viticolaCCRM13		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1078948.peg.1923	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078948.peg.1119	T3S	cation diffusion facilitator family transporter
fig 6666666.1078948.peg.1215	T3S	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
fig 6666666.1078948.peg.1216	T3S	DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit
fig 6666666.1078948.peg.1221	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1078948.peg.1225	T3S	M3 family metallopeptidase
fig 6666666.1078948.peg.125	T3S	oligopeptide:H ⁺ symporter
fig 6666666.1078948.peg.129	T3S	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
fig 6666666.1078948.peg.1339	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1078948.peg.1442	T3S	TonB-like protein
fig 6666666.1078948.peg.1923	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078948.peg.326	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1078948.peg.236	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1078948.peg.4733	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078948.peg.856	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1078948.peg.384	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1078948.peg.4658	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078948.peg.1449	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1078948.peg.1284	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1078948.peg.402	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1078948.peg.4641	T4S	hypothetical protein

X.citripv.viticolaCCRM26		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1078949.peg.3290	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078949.peg.1120	T3S	cation diffusion facilitator family transporter
fig 6666666.1078949.peg.1217	T3S	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
fig 6666666.1078949.peg.1218	T3S	DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit
fig 6666666.1078949.peg.1223	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1078949.peg.1227	T3S	M3 family metallopeptidase
fig 6666666.1078949.peg.125	T3S	oligopeptide:H ⁺ symporter
fig 6666666.1078949.peg.129	T3S	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
fig 6666666.1078949.peg.1341	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1078949.peg.1444	T3S	TonB-like protein
fig 6666666.1078949.peg.3290	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078949.peg.327	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1078949.peg.237	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1078949.peg.1057	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078949.peg.1568	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078949.peg.857	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1078949.peg.385	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1078949.peg.1493	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078949.peg.1451	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1078949.peg.1286	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1078949.peg.403	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1078949.peg.1476	T4S	hypothetical protein

X.citripv.viticolaCCRM33		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076496.peg.2430	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1076496.peg.119	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076496.peg.1246	T3S	DUF3426 domain-containing protein
fig 6666666.1076496.peg.1264	T3S	CD225/dispanin family protein
fig 6666666.1076496.peg.1327	T3S	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
fig 6666666.1076496.peg.1331	T3S	oligopeptide:H ⁺ symporter
fig 6666666.1076496.peg.1370	T3S	XopA/Hpa1 family type III secretion system protein
fig 6666666.1076496.peg.1379	T3S	type III secretion protein HrpB2
fig 6666666.1076496.peg.1387	T3S	4-hydroxyphenylacetate catabolism regulator HpaA
fig 6666666.1076496.peg.1392	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076496.peg.2430	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1076496.peg.1130	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1076496.peg.1220	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076496.peg.400	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076496.peg.4817	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076496.peg.596	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1076496.peg.1070	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1076496.peg.4743	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076496.peg.9	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1076496.peg.171	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1076496.peg.1052	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076496.peg.4726	T4S	hypothetical protein

X.citripv.viticolaCCRM40 prot	Pred	Description
fig 6666666.1078951.peg.273 7	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078951.peg.118	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1078951.peg.124 4	T3S	DUF3426 domain-containing protein
fig 6666666.1078951.peg.126 2	T3S	CD225/dispanin family protein
fig 6666666.1078951.peg.132 5	T3S	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
fig 6666666.1078951.peg.132 9	T3S	oligopeptide:H ⁺ symporter
fig 6666666.1078951.peg.136 8	T3S	XopA/Hpa1 family type III secretion system protein
fig 6666666.1078951.peg.137 7	T3S	type III secretion protein HrpB2
fig 6666666.1078951.peg.138 5	T3S	4-hydroxyphenylacetate catabolism regulator HpaA
fig 6666666.1078951.peg.139 0	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1078951.peg.273 7	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078951.peg.112 9	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1078951.peg.121 8	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1078951.peg.398	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078951.peg.156 8	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078951.peg.598	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1078951.peg.107 0	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1078951.peg.149 3	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078951.peg.9	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1078951.peg.170	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1078951.peg.105 2	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1078951.peg.147 6	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078951.peg.482 1	T4S	hypothetical protein

X.citripv.viticolaCCRM54		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1078952.peg.3274	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078952.peg.1012	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1078952.peg.1133	T3S	cation diffusion facilitator family transporter
fig 6666666.1078952.peg.1175	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1078952.peg.1230	T3S	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
fig 6666666.1078952.peg.1231	T3S	DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit
fig 6666666.1078952.peg.1236	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1078952.peg.1240	T3S	M3 family metalloproteinase
fig 6666666.1078952.peg.127	T3S	oligopeptide:H ⁺ symporter
fig 6666666.1078952.peg.131	T3S	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
fig 6666666.1078952.peg.3274	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078952.peg.327	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1078952.peg.238	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1078952.peg.1070	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078952.peg.1593	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078952.peg.863	T4S	methylenetetrahydrofolate lyase
fig 6666666.1078952.peg.387	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1078952.peg.1518	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078952.peg.1462	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1078952.peg.1299	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1078952.peg.405	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1078952.peg.1501	T4S	hypothetical protein

X.citripv.viticolaCCRM65		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1078953.peg.1925	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078953.peg.1121	T3S	cation diffusion facilitator family transporter
fig 6666666.1078953.peg.1218	T3S	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
fig 6666666.1078953.peg.1219	T3S	DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit
fig 6666666.1078953.peg.1224	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1078953.peg.1228	T3S	M3 family metallopeptidase
fig 6666666.1078953.peg.124	T3S	oligopeptide:H ⁺ symporter
fig 6666666.1078953.peg.128	T3S	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
fig 6666666.1078953.peg.1342	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1078953.peg.1446	T3S	TonB-like protein
fig 6666666.1078953.peg.1925	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078953.peg.323	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1078953.peg.235	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1078953.peg.4824	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078953.peg.858	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1078953.peg.382	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1078953.peg.4751	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078953.peg.1452	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1078953.peg.1287	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1078953.peg.400	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1078953.peg.4734	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078953.peg.4672	T4S	hypothetical protein

X.citripv.viticolaCCRM78		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1078954.peg.3080	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078954.peg.116	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1078954.peg.1233	T3S	domain-containing protein
fig 6666666.1078954.peg.1251	T3S	CD225/dispanin family protein
fig 6666666.1078954.peg.1314	T3S	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
fig 6666666.1078954.peg.1318	T3S	oligopeptide:H ⁺ symporter
fig 6666666.1078954.peg.1319	T3S	Tryptophan 2,3-dioxygenase
fig 6666666.1078954.peg.1356	T3S	XopA/Hpa1 family type III secretion system protein
fig 6666666.1078954.peg.1365	T3S	type III secretion protein HrpB2
fig 6666666.1078954.peg.1373	T3S	4-hydroxyphenylacetate catabolism regulator HpaA
fig 6666666.1078954.peg.3080	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078954.peg.1120	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1078954.peg.1207	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1078954.peg.394	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078954.peg.590	T4S	methylosuccinate lyase
fig 6666666.1078954.peg.1061	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1078954.peg.9	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1078954.peg.169	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1078954.peg.1043	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1078954.peg.4576	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078954.peg.748	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.1078954.peg.3017	T4S	EAL domain-containing protein

X.citripv.viticolaCCRM116		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1078955.peg.2736	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078955.peg.1117	T3S	cation diffusion facilitator family transporter
fig 6666666.1078955.peg.1213	T3S	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
fig 6666666.1078955.peg.1214	T3S	DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit
fig 6666666.1078955.peg.1219	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1078955.peg.1223	T3S	M3 family metallopeptidase
fig 6666666.1078955.peg.124	T3S	oligopeptide:H ⁺ symporter
fig 6666666.1078955.peg.128	T3S	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
fig 6666666.1078955.peg.1336	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1078955.peg.1378	T3S	ArdC-like ssDNA-binding domain-containing protein
fig 6666666.1078955.peg.2736	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078955.peg.325	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1078955.peg.237	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1078955.peg.1054	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078955.peg.1367	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078955.peg.854	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1078955.peg.384	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1078955.peg.1442	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078955.peg.1599	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1078955.peg.1282	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1078955.peg.402	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1078955.peg.1460	T4S	hypothetical protein

X.citripv.viticolaCCRM124		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1078956.peg.2924	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078956.peg.117	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1078956.peg.1193	T3S	lysophosphatidylcholine acyltransferase
fig 6666666.1078956.peg.1223	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1078956.peg.1298	T3S	helix-turn-helix domain-containing protein
fig 6666666.1078956.peg.1374	T3S	MFS transporter
fig 6666666.1078956.peg.1420	T3S	NYN domain-containing protein
fig 6666666.1078956.peg.1421	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1078956.peg.1468	T3S	ArdC-like ssDNA-binding domain-containing protein
fig 6666666.1078956.peg.1483	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1078956.peg.2924	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1078956.peg.3705	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1078956.peg.3618	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1078956.peg.396	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078956.peg.1458	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078956.peg.594	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1078956.peg.1067	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1078956.peg.1532	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1078956.peg.9	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1078956.peg.170	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1078956.peg.1049	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase

X.citripv.viticolaCCRM154		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076499.peg.1895	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1076499.peg.1116	T3S	cation diffusion facilitator family transporter
fig 6666666.1076499.peg.1213	T3S	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
fig 6666666.1076499.peg.1214	T3S	DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit
fig 6666666.1076499.peg.1219	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076499.peg.1223	T3S	M3 family metallopeptidase
fig 6666666.1076499.peg.123	T3S	oligopeptide:H ⁺ symporter
fig 6666666.1076499.peg.127	T3S	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
fig 6666666.1076499.peg.1336	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076499.peg.1439	T3S	TonB-like protein
fig 6666666.1076499.peg.1895	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1076499.peg.324	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1076499.peg.235	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076499.peg.4606	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076499.peg.856	T4S	methylocitrate lyase
fig 6666666.1076499.peg.382	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1076499.peg.4680	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076499.peg.1446	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1076499.peg.1282	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1076499.peg.400	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076499.peg.4699	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076499.peg.4845	T4S	hypothetical protein

X.citripv.viticolaCCRM214		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076491.peg.2046	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1076491.peg.119	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076491.peg.1248	T3S	DUF3426 domain-containing protein
fig 6666666.1076491.peg.1266	T3S	CD225/dispanin family protein
fig 6666666.1076491.peg.1329	T3S	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
fig 6666666.1076491.peg.1333	T3S	oligopeptide:H ⁺ symporter
fig 6666666.1076491.peg.1372	T3S	XopA/Hpa1 family type III secretion system protein
fig 6666666.1076491.peg.1381	T3S	type III secretion protein HrpB2
fig 6666666.1076491.peg.1389	T3S	4-hydroxyphenylacetate catabolism regulator HpaA
fig 6666666.1076491.peg.1394	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076491.peg.2046	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1076491.peg.1134	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1076491.peg.1223	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076491.peg.4741	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076491.peg.599	T4S	methylosuccinate lyase
fig 6666666.1076491.peg.1075	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1076491.peg.4816	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076491.peg.9	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1076491.peg.173	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1076491.peg.1057	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076491.peg.4835	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076491.peg.1549	T4S	hypothetical protein

X.citripv.viticolaCCRM230		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076500.peg.1803	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1076500.peg.1111	T3S	cation diffusion facilitator family transporter
fig 6666666.1076500.peg.120	T3S	oligopeptide:H ⁺ symporter
fig 6666666.1076500.peg.1207	T3S	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
fig 6666666.1076500.peg.1208	T3S	DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit
fig 6666666.1076500.peg.1213	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076500.peg.1217	T3S	M3 family metallopeptidase
fig 6666666.1076500.peg.124	T3S	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
fig 6666666.1076500.peg.1331	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076500.peg.1432	T3S	TonB-like protein
fig 6666666.1076500.peg.1803	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1076500.peg.320	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1076500.peg.232	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076500.peg.847	T4S	methylosuccinate lyase
fig 6666666.1076500.peg.379	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1076500.peg.1438	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1076500.peg.1277	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1076500.peg.397	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076500.peg.4539	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076500.peg.2433	T4S	large Ala/Gln-rich protein
fig 6666666.1076500.peg.690	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.1076500.peg.1740	T4S	EAL domain-containing protein

X.citripv.viticolaCCRM234		
prot	Pred	Description
fig 6666666.1076503.peg.1791	T3S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1076503.peg.1113	T3S	cation diffusion facilitator family transporter
fig 6666666.1076503.peg.1209	T3S	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
fig 6666666.1076503.peg.1210	T3S	DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit
fig 6666666.1076503.peg.1215	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.1076503.peg.1219	T3S	M3 family metallopeptidase
fig 6666666.1076503.peg.124	T3S	oligopeptide:H ⁺ symporter
fig 6666666.1076503.peg.128	T3S	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
fig 6666666.1076503.peg.1332	T3S	L-fucose:H ⁺ symporter permease
fig 6666666.1076503.peg.1434	T3S	TonB-like protein
fig 6666666.1076503.peg.1791	T4S	peptidoglycan-binding protein
fig 6666666.1076503.peg.324	T4S	XopV/AopV family type III secretion system effector
fig 6666666.1076503.peg.236	T4S	XopX family type III secretion system effector
fig 6666666.1076503.peg.851	T4S	methylosuccinate lyase
fig 6666666.1076503.peg.383	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.1076503.peg.1440	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.1076503.peg.1278	T4S	MobA/MobL family protein
fig 6666666.1076503.peg.401	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.1076503.peg.4534	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.1076503.peg.694	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.1076503.peg.1727	T4S	EAL domain-containing protein

CAPÍTULO III

Draft Genome Sequence of Seven Pigmented Strains of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, the Causal Agent of Cashew Angular Spot

Artigo publicado no periódico Phytopathology

Disponível em: doi.org/10.1094/PHYTO-08-22-0279-A

Draft Genome Sequence of Seven Pigmented Strains of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, the Causal Agent of Cashew Angular Spot

Lucas P. Lucena¹, Ana M. Benko-Iseppon², Bertram Brenig³, Vasco Azevedo⁴, Flávia Aburjaile⁵, Elineide B. Souza⁶, and Marco A. S. Gama^{1†}

¹Crop Protection Area, Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brazil

²Department of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

³Department of Molecular Biology of Livestock, Institute of Veterinary Medicine, Georg August University Göttingen, 37077, Göttingen, Germany

⁴Department of Genetics, Ecology and Evolution, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵Department of Preventive Veterinary Medicine, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁶ Microbiology Area, Department of Biology, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brazil

† Corresponding author: M. A. S. Gama; marco.gama@ufrpe.br

Genome Announcement

Cashew (*Anacardium occidentale* L.) angular leaf spot is caused by pigmented and non-pigmented strains of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* (Ah-You et al. 2007) Gama et al. 2018, which have been isolated from infected plants in Brazil (Gama et al. 2018; Gama et al. 2011). The disease was first reported by Robbs et al. (1981), infecting cashew trees in the Brazilian Northeast and Southeast regions. The leaf symptoms include angular spots and dark lesions in the veins and surrounding tissues. The vein darkening moves from the main vein to the secondary veins (Viana et al. 2007) and the petioles, causing extensive dry necrosis of twigs and their tips (Gama et al. 2011). On the fruit, dark necrotic lesions are usually observed (Viana et al. 2007). So far, no symptoms have been observed in the pseudofruit (Gama et al. 2011).

Given that infection in young fruits results in fruits unsuitable for commercialization, the angular leaf spot represents a serious threat to the cashew crop in Brazil (Viana et al., 2007; Gama et al. 2018), especially in the Northeast, as this region produces approximately 99% of the Brazilian cashew nuts (IBGE 2022). In addition, there is no data on the losses caused by this

pathogen in the country. In this study, we report the genomic sequencing of seven pigmented strains of *X. citri* pv. *anacardii*, obtained from the leaves of cashew trees from São Paulo state, Brazil, in 2009, and previously characterized by biochemical, molecular, and pathological techniques (Gama et al. 2011; Gama et al. 2018). The draft genome of these strains will be useful to clarify different aspects of this important bacterium, and it will help minimize the damage caused to the cashew crop.

The strains CCRMTAQ9, CCRMTAQ11, CCRMTAQ14, CCRMTAQ18, CCRMTAQ24, CCRMTAQ29, and CCRMTAQ31 were cultured in NYDA medium (20 g agar, 10 g dextrose, 5 g peptone, 5 g yeast extract, and 3 g meat extract, completing the volume with sterile distilled water [SDW] to 1,000 ml) and incubated for 36 h at 29 °C. DNA from the strains was extracted using the MiniPrep bacterial DNA extraction kit (Axygen Biosciences, MA), according to the manufacturer's recommendations. The DNA concentration was adjusted to 10 ng μ L⁻¹ using a Biodrop (Cambridge, Canada). The construction of the libraries was carried out according to the manufacturer, and whole-genome sequencing was performed using the Illumina HiSeq 2500 platform (San Diego, CA, USA), producing Paired-End (PE) libraries with 150 bp reads. The quality of the reads obtained was evaluated with FastQC (Andrews, 2010), and later the adapters and low-quality readings were removed with Trimmomatic v. 0.32 (Bolger et al. 2014). Then, the *de novo* assembly was performed using the SPAdes software (Bankevich et al. 2012). The assembly data were evaluated by QUAST (Mikheenko et al. 2018). Automatic annotation was also performed with Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) (Overbeek et al. 2014). Data obtained from coding sequences and genome length were compared with the genomes of four strains of *X. citri* pv. *anacardii* available in GenBank database. The completeness analysis was performed using CheckM (Parks et al. 2015). The genomes of the pigmented strains of *X. citri* pv. *anacardii* were compared with the genomes of type and pathotype strains of the genus *Xanthomonas*, obtained from the GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). The average nucleotide identity based on the Mummer aligner (ANIm) was calculated using pyani v.0.2.11 (Pritchard et al. 2015), and the digital DNA-DNA hybridization (dDDH) was performed using the GGDC platform (Meier-Kolthoff et al. 2022). The genomes of the strains were analyzed together with 12 other strains of *X. citri* to obtain the orthologous genes using the Roary pipeline (Page et al. 2015). These genes were aligned by MAFFT 7.487 (Kato and Standley 2013), and the maximum likelihood (ML) phylogenomic tree was obtained by IQ-TREE (Trifinopoulos et al. 2016) and iTOL (Letunic and Bork 2021). The strains were evaluated to find Clustered regularly interspersed palindromic repeat (CRISPR) and associated proteins (Cas) using the online tool CRISPRminer (Zhang et al. 2018). The presence of plasmids in the genomes was checked using PlasmidFinder 2.1 (Carattoli et al. 2014). The effector proteins of type III and type IV secretion systems were predicted using the programs T3SEpp (Hui et al. 2020) and T4Sepre (Wang et al. 2014), with minimum scores of 0.9999 and 0.5, respectively, the predicted sequences were then evaluated against the Genbank database using BLASTP.. Genome size,

number of coding sequences, and N50 ranged from 4,996,984 (CCRMTAQ29) to 5,003,485 bp (CCRMTAQ9), 4,621 (CCRMTAQ9) to 4,643 (CCRMTAQ18), and 113,582 (CCRMTAQ29) to 141,003 (CCRMTAQ24) (Table 1). GC content and RNA numbers were 64.68% and 54 for all strains. When compared with the other genomes of *X. citri* pv. *anacardii* available in Genbank, the genome size of the strain IBSBF2579^{PT} showed the greatest variation in relation to the average of the genomes sequenced in this study, which was about 7%, while the strain CCRMTAQ13 showed the smallest difference, with a value close to 1.5%. Regarding the coding sequences, IBSBF2579^{PT} also showed the greatest variation, with an 8.8% difference in relation to the seven genomes sequenced in this work, while CFBP2913 showed the smallest relative difference, with about 2%. CheckM analysis showed >99.5% of completeness for the seven strains. ANIm and dDDH analyses showed values of 100% and above 98.5% among the pigmented strains of *X. citri* pv. *anacardii* sequenced in this study, while values above 99.5% and 92.1% were observed among these strains and the non-pigmented pathotype strain of *X. citri* pv. *anacardii* (IBSBF2579^{PT}) (Fig. 1A). ANI and dDDH values above 96.2% and 77.4% were observed among *X. citri* pv. *anacardii* and other pathovars of *X. citri*. In addition, ANI values among *X. citri* pv. *anacardii* and the type strain *X. citri* (LMG9322^T) were 99.3%, while dDDH values ranged from 77.4% to 81.7%. Thus, regarding that ANI and dDDH values for species delineation cut-off are below 95% and 70% (Goris et al. 2007; Chung et al. 2018), these results confirm the identity of the strains sequenced in this study. The analysis of orthologous genes revealed 2,708 core, 3,533 shell, and 7,075 cloud genes. No softcore genes were detected. The ML tree built with the core genes grouped all *X. citri* pv. *anacardii* strains in the same clade, with a 100% bootstrap (Fig. 1B). In addition, the pathovars of *X. citri* were divided into two phylogenetic groups, as already observed in other studies (Gama et al. 2018; Ferreira et al. 2019). The CRISPR-Cas evaluation detected one CRISPR array for each of the seven strains, including Cas proteins, all strains sequenced in this study corresponded to class I (Supplementary Fig. S1) (Makarova et al. 2015) no polymorphism was observed in the spacers of the seven sequenced strains. The analyses performed by PlasmidFinder on the genomes showed that there were no detectable plasmids in any of the seven strains sequenced in this study. The number of effector proteins predicted of type III secretion system ranged from 14 (CCRMTAQ11, CCRMTAQ24 and CCRMTAQ31) to 16 (CCRMTAQ19 and CCRMTAQ14), while the effector proteins predicted for type IV secretion systems ranged from 50 (CCRMTAQ24, CCRMTAQ29, and CCRMTAQ31) to 53 (CCRMTAQ14) (Supplementary Table S1).

These resources will contribute in a relevant way to help understand the ecological, taxonomic, evolutionary, pathogenicity, and virulence aspects of *X. citri* pv. *anacardii*, which will be helpful for the study and development of techniques for managing cashew angular leaf spot.

Data Availability

The genome sequences of the strains CCRMTAQ9, CCRMTAQ11, CCRMTAQ14, CCRMTAQ18, CCRMTAQ24, CCRMTAQ29 e CCRMTAQ31 have been deposited in the NCBI database under Biosample accession numbers SAMN29417860, SAMN29417861, SAMN29417862, SAMN29417867, SAMN29417863, SAMN29417864, and SAMN29417865, under BioProject accession number PRJNA854066. The strains used in this study are available at the Culture Collection of the Laboratory of Plant Bacteriology of the Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Acknowledgments

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance Code 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Técnico e Científico (CNPq) for the scholarships awarded to L. P. Lucena (Proc. nº 140052/2020-8).

Literature Cited

Andrews, S. 2010. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A. And Pevzner, P. A. 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* 19:455–477.

Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. And Sayers, E. W. 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41:D36-42.

Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114-2120

Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernandez, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M., and Hasman, H. 2014. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmidmultilocus sequence typing. *Antimicrobiol. Agents Chemother.* 58:3895-3903.

Chung, M., Munro, J. B., Tettelin, H., and Dunning Hotopp, J. C. 2018. Using Core Genome Alignments To Assign Bacterial Species. *mSystems*. 3:e00236-18.

Ferreira, M. A. S. V., Bonneau, S., Briand, M., Cesbron, S., Portier, P., Darrasse, A., Gama, M. A. S., Barbosa, M. A. G., Mariano, R. D. L. R., Souza, E. B. and Jacques, M. 2019. *Xanthomonas citri* pv. *viticola* Affecting Grapevine in Brazil: Emergence of a Successful Monomorphic Pathogen. *Frontiers in Plant Science*. 10.

Gama, M. A. S., Mariano, R. D. L. R., Silva Júnior, W. J., Farias, A. R. G., Barbosa, M. A. G., Ferreira, M. Á. D. S. V., Costa Júnior, C. R. L., Santos, L. A. And Souza, E. B. 2018. Taxonomic Repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and Emendation of the Description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to Include Pigmented Isolates Pathogenic to Cashew Plant. *Phytopathology*. 108:1143–1153.

Gama, M. A. S., Mariano, R. L. R., Viana, F. M. P., Ferreira, M. A. S. V., and Souza, E. B. 2011. Polyphasic Characterization of Pigmented Strains of *Xanthomonas* Pathogenic to Cashew Trees. *Plant Dis*. 95:793–802.

Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., and Tiedje, J. M. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 57:81–91.

Hui, X., Chen, Z., Lin, M., Zhang, J., Hu, Y., Zeng, Y., Cheng, X., Ou-Yang, L., Sun M., White, A. P., Wang, Y. 2020. T3SEPP: An integrated prediction pipeline for bacterial type III secreted effectors. *mSystems*. 5.

IBGE. 2021. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Available: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa>. Accessed 18 July 2022.

Katoh, K., and Standley, D. M. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol*. 30:772–780.

Letunic, I., and Bork, P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 49:W293–W296.

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., van der Oost, J., Backofen, R., Koonin, E. V. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas Systems. *Nature Reviews Microbiology.* 13:722–736.

Meier-Kolthoff, J. P., Carbasse, J. S., Peinado-Olarte, R. L., and Göker, M. 2022. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 50:D801–D807.

Mikheenko, A., Pribelski, A., Saveliy, V., Antipov, D., and Gurevich, A. 2018. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics.* 34:i142–i150.

Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., and von Haeseler, A. 2013. Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. *Mol. Biol. Evol.* 30:1188–1195.

Overbeek R., Olson R., Pusch G. D., Olsen G. J., Davis J.J., Disz T., Edwards R. A., Gerdes S., Parrello B., Shukla M., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F., Stevens R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 42:D206-14.

Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., Parkhill, J. 2015. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 31:3691–3693.

Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., and Tyson, G. W. 2015. CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 25:1043-1055.

Pritchard, L., Glover, R. H., Humphris, S., Elphinstone, J. G., and Toth, I. K. 2015. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal. Methods*. 8:12–24.

Robbs, C. F., Neto, J. R., Ribeiro, R. L. D., and Kimura, O. 1981. Annotated list of bacterial plant pathogens in Brazil. Pages 601-612. *Proc. 5th Int. Plant Pathogenic Bacteria*, CIAT, Cali.

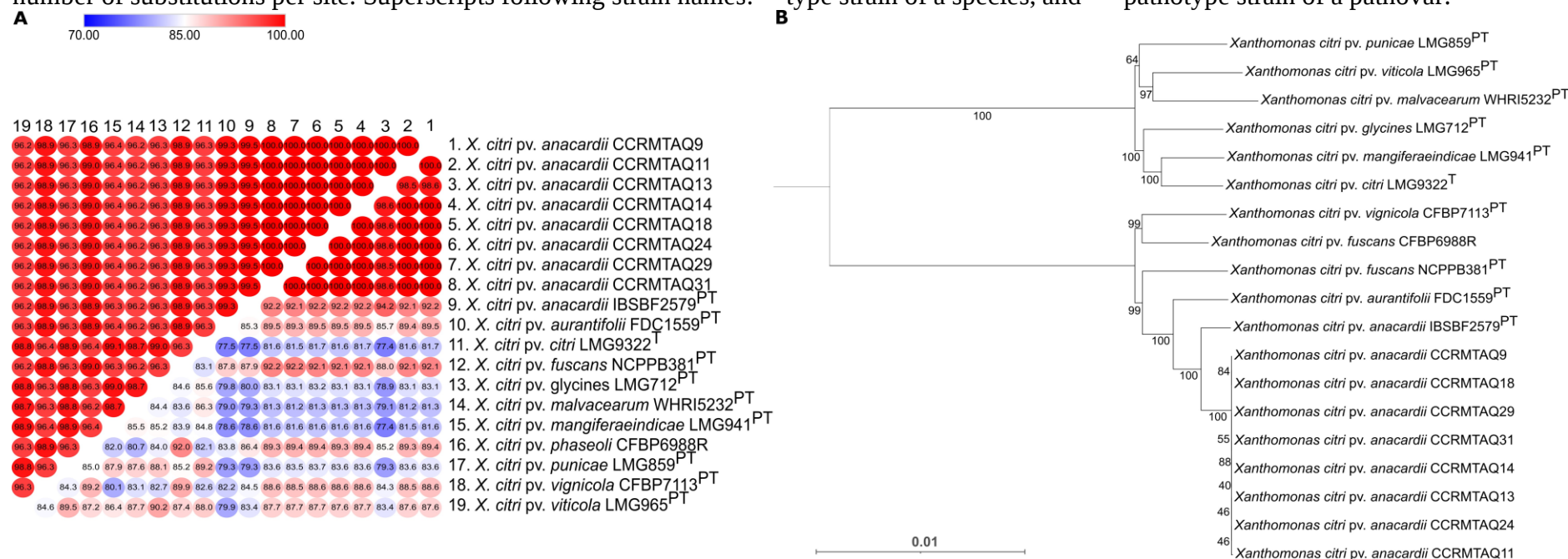
Trifinopoulos, J., Nguyen, L.-T., von Haeseler, A., and Minh, B. Q. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44:W232–W235.

Viana, F. M. P., Cardoso, J. E., Saraiva, H. A. O., Ferreira, M. A. S. V., Mariano, R. L. R., and Trindade, L. C. 2007. First Report of a Bacterial Leaf and Fruit Spot of Cashew Nut (*Anacardium occidentale*) Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* in Brazil. *Plant Dis.* 91:1361–1361.

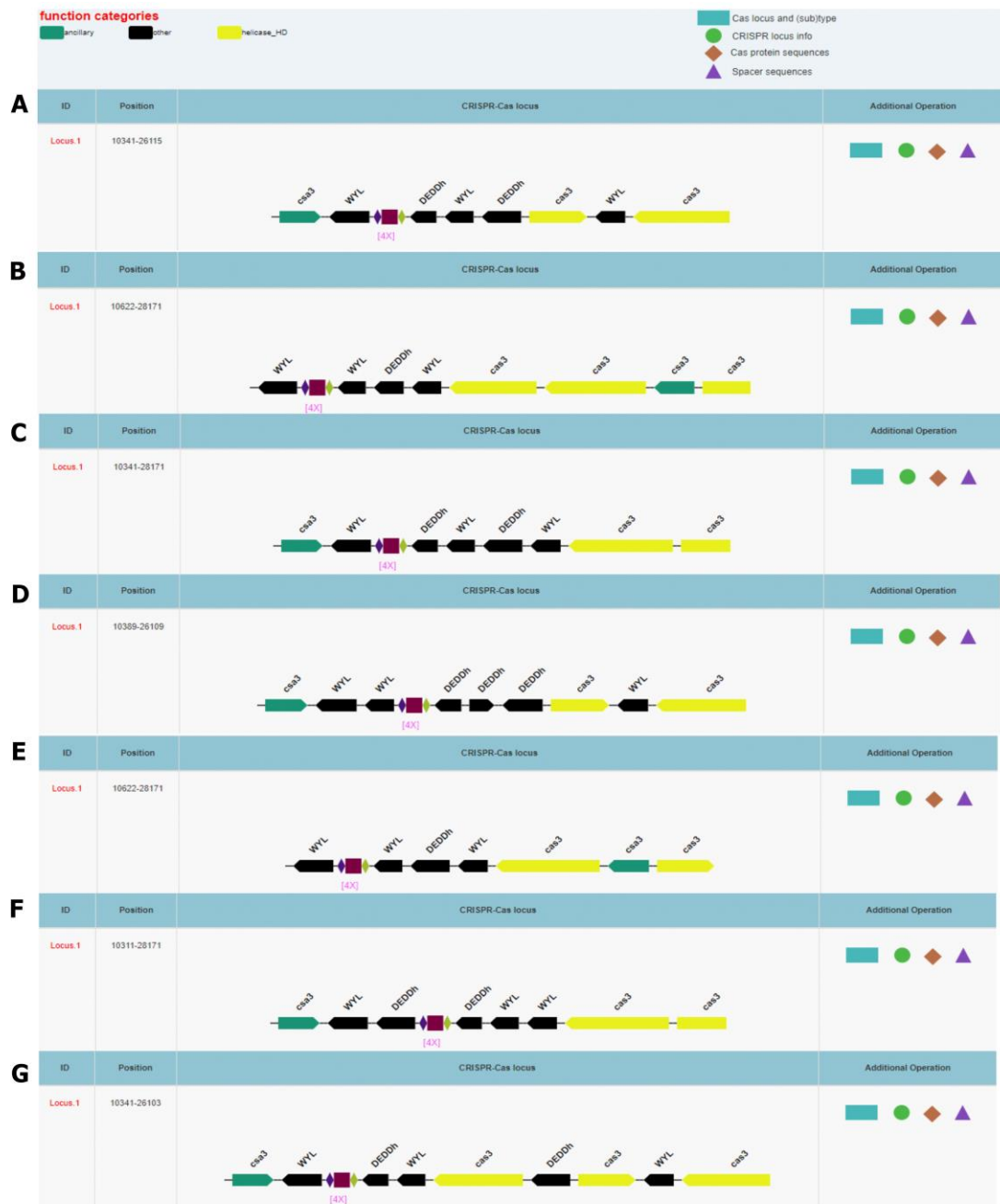
Wang, Y., Wei, X., Bao, H., and Liu, S. 2014. Prediction of bacterial type IV secreted effectors by C-terminal features. *BMC Genomics*. 15:50.

Zhang, F., Zhao, S., Ren, C., Zhu, Y., Zhou, H., Lai, Y., Zhou, F., Jia, Y., Zheng, K., and Huang, Z. 2018. CRISPRminer is a knowledge base for exploring CRISPR-Cas systems in microbe and phage interactions. *Commun. Biol.* 1:180.

Fig. 1. A, Heatmap representing the percentage of identity (average nucleotide identity based on the Mummer aligner [ANIm]) and digital DNA-DNA hybridization (dDDH) between sequenced strains of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* (CCRMTAQ9, CCRMTAQ11, CCRMTAQ14, CCRMTAQ18, CCRMTAQ24, CCRMTAQ29, and CCRMTAQ31) and pathovars of *X. citri*. The upper triangle shows the ANIm values, and the lower triangle shows the dDDH values. **B**, Maximum-likelihood phylogenetic tree based on core genes of sequenced strains of *X. citri* pv. *anacardii* and pathovars of *X. citri*. Numbers at nodes are bootstrap values (>50%) from 1,000 repetitions. The bar represents the expected number of substitutions per site. Superscripts following strain names: ^T=type strain of a species, and ^{PT}=pathotype strain of a pathovar.



Supplementary Fig. S1. Visualization of the CRISPR arrays and cas genetic loci in genomes of the strains **A**, CCRMTAQ9, **B**, CCRMTAQ11, **C**, CCRMTAQ14, **D**, CCRMTAQ18, **E**, CCRMTAQ24, **F**, CCRMTAQ29, and **G**, CCRMTAQ31.



Supplementary Table S1. *Xanthomonas citri* strains involved in ANIm and core genome analyses of Figure 1.

<i>X. citri</i> pv.	Strain	Genome Lenght	Accession number	
			BioProject	BioSample
<i>anacardii</i>	CCRMTAQ9	5,003,485		SAMN29417860
<i>anacardii</i>	CCRMTAQ11	4,998,773		SAMN29417861
<i>anacardii</i>	CCRMTAQ14	5,003,266		SAMN29417862
<i>anacardii</i>	CCRMTAQ18	5,003,158	PRJNA854066	SAMN29417867
<i>anacardii</i>	CCRMTAQ24	5,003,227		SAMN29417863
<i>anacardii</i>	CCRMTAQ29	4,996,984		SAMN29417864
<i>anacardii</i>	CCRMTAQ31	5,002,303		SAMN29417865
<i>anacardii</i>	IBSBF 2579 ^{PT}	5,350,842	PRJNA416784	SAMN07964563
<i>anacardii</i>	CCRMTAQ13	5,084,712	PRJNA416789	SAMN07964775
<i>punicae</i>	LMG 859 ^{PT}	4,946,642	PRJNA476038	SAMN09425328
<i>viticola</i>	LMG 965 ^{PT}	5,105,036	PRJEB5493	SAMEA3139044
<i>glycines</i>	LMG 712 ^{PT}	5,231,572	PRJNA298608	SAMN04145201
<i>mangiferaeindicae</i>	LMG 941 ^{PT}	5,111,537	PRJEA86101	SAMEA2272013
<i>citri</i>	LMG 9322 ^T	5,141,632	PRJNA338819	SAMN05571463
<i>vignicola</i>	CFBP 7113 ^{PT}	5,105,205	PRJNA390890	SAMN07251989
<i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP 6988R	5,199,271	PRJNA384160	SAMN06829542
<i>fuscans</i>	NCPPB 381 ^{PT}	4,955,361	PRJNA264772	SAMN03142398
<i>aurantifolii</i>	FDC 1559 ^{PT}	5,272,646	PRJNA273983	SAMN03317020
<i>malvacearum</i>	WHRI 5232 ^{PT}	5,235,373	PRJNA438827	SAMN08729580

^TType strain; ^{PT} Pathotype strain;

Supplementary Table S2. Type III and IV effector proteins predicted in the genomes of the strains (CCRMATAQ9, CCRMATAQ11, CCRMATAQ14, CCRMATAQ18, CCRMATAQ24, CCRMATAQ29, and CCRMATAQ31) of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* sequenced in this study.

CCRMATAQ9		
prot	Pred	Description
fig 6666666.867840.peg.1063	T3S	type III secretion protein HrpB7
fig 6666666.867840.peg.1089	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.1092	T3S	HrpF/NolX family T3SS translocon protein
fig 6666666.867840.peg.113	T3S	ribonuclease G
fig 6666666.867840.peg.1172	T3S	Cache 3/Cache 2 fusion domain-containing protein
fig 6666666.867840.peg.1239	T3S	FliH/SctL family protein
fig 6666666.867840.peg.1375	T3S	RNA polymerase-binding protein DksA
fig 6666666.867840.peg.1407	T3S	cell division protein FtsQ/DivIB
fig 6666666.867840.peg.1473	T3S	LemA family protein
fig 6666666.867840.peg.1580	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.1588	T3S	avirulence protein
fig 6666666.867840.peg.1599	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.1661	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.1722	T3S	type III effector
fig 6666666.867840.peg.1739	T3S	TonB-dependent receptor
fig 6666666.867840.peg.1820	T3S	Ribonuclease E (RNase E)
fig 6666666.867840.peg.1829	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.1830	T4S	avirulence protein
fig 6666666.867840.peg.1923	T4S	putative <i>Xanthomonas</i> outer protein L
fig 6666666.867840.peg.1956	T4S	No significant similarity found
fig 6666666.867840.peg.2006	T4S	polyphosphate kinase (Polyphosphoric acid kinase) (ATP- polyphosphate phosphotransferase)
fig 6666666.867840.peg.2043	T4S	malate dehydrogenase
fig 6666666.867840.peg.2103	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.867840.peg.2125	T4S	tRNA (guanosine(37)-N1)-methyltransferase TrmD
fig 6666666.867840.peg.2191	T4S	EF-hand domain-containing protein
fig 6666666.867840.peg.2223	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.2225	T4S	outer protein P
fig 6666666.867840.peg.2261	T4S	c-type cytochrome
fig 6666666.867840.peg.2262	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.233	T4S	pirin family protein
fig 6666666.867840.peg.2372	T4S	phosphomannomutase
fig 6666666.867840.peg.2561	T4S	site-specific integrase
fig 6666666.867840.peg.2771	T4S	Lacl family transcriptional regulator
fig 6666666.867840.peg.2882	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.2899	T4S	EF-hand domain-containing protein
fig 6666666.867840.peg.2911	T4S	putative peptidoglycan-binding protein, lysM containing domain
fig 6666666.867840.peg.3054	T4S	nucleoside hydrolase
fig 6666666.867840.peg.3068	T4S	ABC transporter substrate-binding protein
fig 6666666.867840.peg.3243	T4S	pectate lyase
fig 6666666.867840.peg.3486	T4S	virulence RhuM family protein
fig 6666666.867840.peg.3528	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.3700	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.867840.peg.3791	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.3792	T4S	alpha-L-fucosidase
fig 6666666.867840.peg.380	T4S	hypothetical protein

fig 6666666.867840.peg.3808	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.3903	T4S	integrase
fig 6666666.867840.peg.3934	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.867840.peg.3994	T4S	LysR substrate-binding domain-containing protein
fig 6666666.867840.peg.4050	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.4059	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.4142	T4S	EcsC family protein
fig 6666666.867840.peg.4174	T4S	transducer protein car
fig 6666666.867840.peg.419	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.867840.peg.4263	T4S	glucose-6-phosphate dehydrogenase
fig 6666666.867840.peg.4299	T4S	serine/threonine-protein kinase
fig 6666666.867840.peg.4364	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.4370	T4S	DNA-binding protein
fig 6666666.867840.peg.439	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.867840.peg.4443	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.4517	T4S	ADP-ribosyltransferase domain-containing protein
fig 6666666.867840.peg.4522	T4S	zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
fig 6666666.867840.peg.456	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.867840.peg.4605	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867840.peg.608	T4S	F0F1 ATP synthase subunit gamma
fig 6666666.867840.peg.687	T4S	manganese catalase family protein
fig 6666666.867840.peg.793	T4S	hypothetical protein

CCRMTAQ11		
prot	Pred	Description
fig 6666666.867838.peg.932	T3S	putative Xanthomonas outer protein L
fig 6666666.867838.peg.1077	T3S	Xanthomonas outer protein P1, type III effector XopP1
fig 6666666.867838.peg.1108	T3S	Xanthomonas outer protein AM
fig 6666666.867838.peg.1299	T3S	type III effector
fig 6666666.867838.peg.1409	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.1410	T3S	avirulence protein
fig 6666666.867838.peg.1466	T3S	avirulence protein
fig 6666666.867838.peg.1477	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.1853	T3S	Outer protein F1
fig 6666666.867838.peg.1856	T3S	HrpF/NolX family T3SS translocon protein
fig 6666666.867838.peg.2809	T3S	nucleoside hydrolase
fig 6666666.867838.peg.4116	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.4342	T3S	serine/threonine-protein kinase
fig 6666666.867838.peg.4547	T3S	type III effector HopG1
fig 6666666.867838.peg.28	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.67	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.867838.peg.87	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.867838.peg.104	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.867838.peg.258	T4S	F0F1 ATP synthase subunit gamma
fig 6666666.867838.peg.339	T4S	manganese catalase family protein
fig 6666666.867838.peg.472	T4S	Cache 3/Cache 2 fusion domain-containing protein
fig 6666666.867838.peg.545	T4S	zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
fig 6666666.867838.peg.677	T4S	RNA polymerase-binding protein DksA
fig 6666666.867838.peg.709	T4S	cell division protein FtsQ/DivIB
fig 6666666.867838.peg.753	T4S	NupC/NupG family nucleoside CNT transporter
fig 6666666.867838.peg.772	T4S	LemA family protein
fig 6666666.867838.peg.1043	T4S	EF-hand domain-containing protein

fig 6666666.867838.peg.1157	T4S	pirin family protein
fig 6666666.867838.peg.1317	T4S	TonB-dependent receptor
fig 6666666.867838.peg.1399	T4S	Ribonuclease E (RNase E)
fig 6666666.867838.peg.1458	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.1539	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.1709	T4S	site-specific integrase
fig 6666666.867838.peg.1828	T4S	type III secretion protein HrpB7
fig 6666666.867838.peg.1972	T4S	ribonuclease G
fig 6666666.867838.peg.2012	T4S	malate dehydrogenase
fig 6666666.867838.peg.2073	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.867838.peg.2108	T4S	LysR substrate-binding domain-containing protein
fig 6666666.867838.peg.2135	T4S	c-type cytochrome
fig 6666666.867838.peg.2136	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.2244	T4S	phosphomannomutase
fig 6666666.867838.peg.2530	T4S	LacI family transcriptional regulator
fig 6666666.867838.peg.2638	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.2655	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.2824	T4S	ABC transporter substrate-binding protein
fig 6666666.867838.peg.2868	T4S	pectate lyase
fig 6666666.867838.peg.3397	T4S	virulence RhuM family protein
fig 6666666.867838.peg.3439	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.3622	T4S	polyphosphate kinase (Polyphosphoric acid kinase) (ATP- polyphosphate phosphotransferase)
fig 6666666.867838.peg.3747	T4S	putative phosphodiesterase
fig 6666666.867838.peg.3793	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.867838.peg.3841	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.3842	T4S	alpha-L-fucosidase
fig 6666666.867838.peg.3953	T4S	site-specific integrase
fig 6666666.867838.peg.3984	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.867838.peg.4073	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.4200	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.4320	T4S	glucose-6-phosphate dehydrogenase
fig 6666666.867838.peg.4365	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.4387	T4S	DNA-binding protein
fig 6666666.867838.peg.4461	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.4462	T4S	No significant similarity found
fig 6666666.867838.peg.4537	T4S	ADP-ribosyltransferase domain-containing protein
fig 6666666.867838.peg.4617	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867838.peg.977	T4S	tRNA (guanosine(37)-N1)-methyltransferase TrmD

CCRMTAQ14		
prot	Pred	Description
fig 6666666.867839.peg.915	T3S	Outer protein F1
fig 6666666.867839.peg.918	T3S	HrpF/NoIX family T3SS translocon protein
fig 6666666.867839.peg.1483	T3S	putative Xanthomonas outer protein L
fig 6666666.867839.peg.1638	T3S	Xanthomonas outer protein P1, type III effector XopP1
fig 6666666.867839.peg.1670	T3S	Xanthomonas outer protein AM
fig 6666666.867839.peg.1693	T3S	type III effector
fig 6666666.867839.peg.1804	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.1805	T3S	avirulence protein
fig 6666666.867839.peg.1863	T3S	avirulence protein
fig 6666666.867839.peg.1873	T3S	hypothetical protein

fig 6666666.867839.peg.2360	T3S	murein L,D-transpeptidase
fig 6666666.867839.peg.2367	T3S	type III effector HopG1
fig 6666666.867839.peg.3108	T3S	nucleoside hydrolase
fig 6666666.867839.peg.3470	T3S	lytic transglycosylase domain-containing protein
fig 6666666.867839.peg.4096	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.4344	T3S	serine/threonine-protein kinase
fig 6666666.867839.peg.35	T4S	preprotein translocase subunit SecG
fig 6666666.867839.peg.104	T4S	ribonuclease G
fig 6666666.867839.peg.228	T4S	pirin family protein
fig 6666666.867839.peg.375	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.413	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.867839.peg.433	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.867839.peg.450	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.867839.peg.600	T4S	F0F1 ATP synthase subunit gamma
fig 6666666.867839.peg.680	T4S	manganese catalase family protein
fig 6666666.867839.peg.890	T4S	type III secretion protein HrpB7
fig 6666666.867839.peg.963	T4S	polyphosphate kinase (Polyphosphoric acid kinase) (ATP- polyphosphate phosphotransferase)
fig 6666666.867839.peg.1001	T4S	malate dehydrogenase
fig 6666666.867839.peg.1062	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.867839.peg.1097	T4S	LysR substrate-binding domain-containing protein
fig 6666666.867839.peg.1179	T4S	Cache 3/Cache 2 fusion domain-containing protein
fig 6666666.867839.peg.1252	T4S	zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
fig 6666666.867839.peg.1384	T4S	RNA polymerase-binding protein DksA
fig 6666666.867839.peg.1516	T4S	No significant similarity found
fig 6666666.867839.peg.1536	T4S	tRNA (guanosine(37)-N1)-methyltransferase TrmD
fig 6666666.867839.peg.1603	T4S	EF-hand domain-containing protein
fig 6666666.867839.peg.1711	T4S	TonB-dependent receptor
fig 6666666.867839.peg.1794	T4S	Ribonuclease E (RNase E)
fig 6666666.867839.peg.1855	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.1936	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.2111	T4S	c-type cytochrome
fig 6666666.867839.peg.2112	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.2222	T4S	phosphomannomutase
fig 6666666.867839.peg.2522	T4S	site-specific integrase
fig 6666666.867839.peg.2729	T4S	LacI family transcriptional regulator
fig 6666666.867839.peg.2838	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.2874	T4S	LemA family protein
fig 6666666.867839.peg.2953	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.2965	T4S	putative peptidoglycan-binding protein, lysM containing domain
fig 6666666.867839.peg.3122	T4S	ABC transporter substrate-binding protein
fig 6666666.867839.peg.3245	T4S	pectate lyase
fig 6666666.867839.peg.3336	T4S	cell division protein FtsQ/DivIB
fig 6666666.867839.peg.3555	T4S	virulence RhuM family protein
fig 6666666.867839.peg.3597	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.3735	T4S	putative phosphodiesterase
fig 6666666.867839.peg.3780	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.867839.peg.3829	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.3830	T4S	alpha-L-fucosidase
fig 6666666.867839.peg.3943	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.3974	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.867839.peg.4061	T4S	DUF2145 domain-containing protein

fig 6666666.867839.peg.4179	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.4306	T4S	glucose-6-phosphate dehydrogenase
fig 6666666.867839.peg.4367	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.4399	T4S	DNA-binding protein
fig 6666666.867839.peg.4421	T4S	PilX N-terminal domain-containing pilus assembly protein
fig 6666666.867839.peg.4468	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867839.peg.4540	T4S	ADP-ribosyltransferase domain-containing protein
fig 6666666.867839.peg.4623	T4S	hypothetical protein

CCRMTAQ18		
prot	Pred	Description
fig 6666666.867835.peg.750	T3S	Outer protein F1
fig 6666666.867835.peg.753	T3S	HrpF/NolX family T3SS translocon protein
fig 6666666.867835.peg.1181	T3S	putative Xanthomonas outer protein L
fig 6666666.867835.peg.1729	T3S	avirulence protein
fig 6666666.867835.peg.1740	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.1955	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.1957	T3S	Type III secretion system effector protein
fig 6666666.867835.peg.1992	T3S	type III effector HopG1
fig 6666666.867835.peg.2732	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.2733	T3S	avirulence protein
fig 6666666.867835.peg.2991	T3S	nucleoside hydrolase
fig 6666666.867835.peg.3352	T3S	type III effector
fig 6666666.867835.peg.4070	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.4185	T3S	Xanthomonas outer protein AM
fig 6666666.867835.peg.4308	T3S	serine/threonine-protein kinase
fig 6666666.867835.peg.29	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.66	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.867835.peg.86	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.867835.peg.103	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.867835.peg.302	T4S	ribonuclease G
fig 6666666.867835.peg.436	T4S	F0F1 ATP synthase subunit gamma
fig 6666666.867835.peg.516	T4S	manganese catalase family protein
fig 6666666.867835.peg.725	T4S	type III secretion protein HrpB7
fig 6666666.867835.peg.798	T4S	polyphosphate kinase (Polyphosphoric acid kinase) (ATP- polyphosphate phosphotransferase)
fig 6666666.867835.peg.835	T4S	malate dehydrogenase
fig 6666666.867835.peg.895	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.867835.peg.931	T4S	LysR substrate-binding domain-containing protein
fig 6666666.867835.peg.1015	T4S	Cache 3/Cache 2 fusion domain-containing protein
fig 6666666.867835.peg.1215	T4S	No significant similarity found
fig 6666666.867835.peg.1351	T4S	RNA polymerase-binding protein DksA
fig 6666666.867835.peg.1383	T4S	cell division protein FtsQ/DivIB
fig 6666666.867835.peg.1450	T4S	LemA family protein
fig 6666666.867835.peg.1566	T4S	pirin family protein
fig 6666666.867835.peg.1721	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.1803	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.1854	T4S	tRNA (guanosine(37)-N1)-methyltransferase TmdD
fig 6666666.867835.peg.1923	T4S	EF-hand domain-containing protein
fig 6666666.867835.peg.2108	T4S	c-type cytochrome
fig 6666666.867835.peg.2109	T4S	hypothetical protein

fig 6666666.867835.peg.2215	T4S	phosphomannomutase
fig 6666666.867835.peg.2407	T4S	site-specific integrase
fig 6666666.867835.peg.2640	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.2722	T4S	Ribonuclease E (RNase E)
fig 6666666.867835.peg.2751	T4S	LacI family transcriptional regulator
fig 6666666.867835.peg.2835	T4S	EF-hand domain-containing protein
fig 6666666.867835.peg.2848	T4S	putative peptidoglycan-binding protein, lysM containing domain
fig 6666666.867835.peg.3006	T4S	ABC transporter substrate-binding protein
fig 6666666.867835.peg.3180	T4S	pectate lyase
fig 6666666.867835.peg.3334	T4S	TonB-dependent receptor
fig 6666666.867835.peg.3460	T4S	virulence RhuM family protein
fig 6666666.867835.peg.3503	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.3560	T4S	glucose-6-phosphate dehydrogenase
fig 6666666.867835.peg.3690	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.867835.peg.3770	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.3771	T4S	alpha-L-fucosidase
fig 6666666.867835.peg.3884	T4S	site-specific integrase
fig 6666666.867835.peg.3915	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.867835.peg.4002	T4S	DUF2145 domain-containing protein
fig 6666666.867835.peg.4153	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.4257	T4S	EAL domain-containing protein
fig 6666666.867835.peg.4345	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.4378	T4S	DNA-binding protein
fig 6666666.867835.peg.4454	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867835.peg.4539	T4S	ADP-ribosyltransferase domain-containing protein
fig 6666666.867835.peg.4551	T4S	zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
fig 6666666.867835.peg.4626	T4S	hypothetical protein

CCRMTAQ24		
prot	Pred	Description
fig 6666666.867836.peg.717	T3S	type III effector HopG1
fig 6666666.867836.peg.1397	T3S	putative Xanthomonas outer protein L
fig 6666666.867836.peg.1717	T3S	Xanthomonas outer protein P1, type III effector XopP1
fig 6666666.867836.peg.1748	T3S	Xanthomonas outer protein AM
fig 6666666.867836.peg.1771	T3S	type III effector
fig 6666666.867836.peg.1880	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.1881	T3S	avirulence protein
fig 6666666.867836.peg.1938	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.1948	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.2324	T3S	Outer protein F1
fig 6666666.867836.peg.2327	T3S	HrpF/NolX family T3SS translocon protein
fig 6666666.867836.peg.3030	T3S	nucleoside hydrolase
fig 6666666.867836.peg.4201	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.4329	T3S	serine/threonine-protein kinase
fig 6666666.867836.peg.113	T4S	ribonuclease G
fig 6666666.867836.peg.235	T4S	pirin family protein
fig 6666666.867836.peg.305	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.343	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.867836.peg.363	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.867836.peg.380	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.867836.peg.531	T4S	F0F1 ATP synthase subunit gamma

fig 6666666.867836.peg.610	T4S	manganese catalase family protein
fig 6666666.867836.peg.875	T4S	polyphosphate kinase (Polyphosphoric acid kinase) (ATP- polyphosphate phosphotransferase)
fig 6666666.867836.peg.911	T4S	malate dehydrogenase
fig 6666666.867836.peg.972	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.867836.peg.1007	T4S	LysR substrate-binding domain-containing protein
fig 6666666.867836.peg.1091	T4S	Cache 3/Cache 2 fusion domain-containing protein
fig 6666666.867836.peg.1163	T4S	zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
fig 6666666.867836.peg.1298	T4S	RNA polymerase-binding protein DksA
fig 6666666.867836.peg.1431	T4S	No significant similarity found
fig 6666666.867836.peg.1466	T4S	cell division protein FtsQ/DivIB
fig 6666666.867836.peg.1536	T4S	LemA family protein
fig 6666666.867836.peg.1615	T4S	tRNA (guanosine(37)-N1)-methyltransferase TrmD
fig 6666666.867836.peg.1682	T4S	EF-hand domain-containing protein
fig 6666666.867836.peg.1789	T4S	TonB-dependent receptor
fig 6666666.867836.peg.1871	T4S	Ribonuclease E (RNase E)
fig 6666666.867836.peg.1930	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.2011	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.2181	T4S	site-specific integrase
fig 6666666.867836.peg.2299	T4S	type III secretion protein HrpB7
fig 6666666.867836.peg.2354	T4S	c-type cytochrome
fig 6666666.867836.peg.2355	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.2464	T4S	phosphomannomutase
fig 6666666.867836.peg.2751	T4S	LacI family transcriptional regulator
fig 6666666.867836.peg.2859	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.2876	T4S	EF-hand domain-containing protein
fig 6666666.867836.peg.3045	T4S	ABC transporter substrate-binding protein
fig 6666666.867836.peg.3167	T4S	pectate lyase
fig 6666666.867836.peg.3540	T4S	virulence RhuM family protein
fig 6666666.867836.peg.3582	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.3640	T4S	glucose-6-phosphate dehydrogenase
fig 6666666.867836.peg.3835	T4S	putative phosphodiesterase
fig 6666666.867836.peg.3881	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.867836.peg.3930	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.3931	T4S	alpha-L-fucosidase
fig 6666666.867836.peg.4041	T4S	site-specific integrase
fig 6666666.867836.peg.4071	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.867836.peg.4133	T4S	DUF2145 domain-containing protein
fig 6666666.867836.peg.4338	T4S	EcsC protein family protein
fig 6666666.867836.peg.4372	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.4394	T4S	DNA-binding protein
fig 6666666.867836.peg.4462	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867836.peg.4539	T4S	ADP-ribosyltransferase domain-containing protein
fig 6666666.867836.peg.4612	T4S	hypothetical protein

CCRMTAQ29		
prot	Pred	Description
fig 6666666.867837.peg.919	T3S	Outer protein F1
fig 6666666.867837.peg.922	T3S	HrpF/NolX family T3SS translocon protein
fig 6666666.867837.peg.1330	T3S	putative Xanthomonas outer protein L
fig 6666666.867837.peg.1485	T3S	Xanthomonas outer protein P1, type III effector XopP1
fig 6666666.867837.peg.1516	T3S	Xanthomonas outer protein AM

fig 6666666.867837.peg.1541	T3S	type III effector HopG1
fig 6666666.867837.peg.1677	T3S	type III effector
fig 6666666.867837.peg.1787	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.1788	T3S	avirulence protein
fig 6666666.867837.peg.1844	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.1854	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.2972	T3S	nucleoside hydrolase
fig 6666666.867837.peg.3835	T3S	peptidase
fig 6666666.867837.peg.4120	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.4344	T3S	serine/threonine-protein kinase
fig 6666666.867837.peg.114	T4S	ribonuclease G
fig 6666666.867837.peg.235	T4S	pirin family protein
fig 6666666.867837.peg.383	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.421	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.867837.peg.441	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.867837.peg.458	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.867837.peg.608	T4S	FOF1 ATP synthase subunit gamma
fig 6666666.867837.peg.687	T4S	manganese catalase family protein
fig 6666666.867837.peg.894	T4S	type III secretion protein HrpB7
fig 6666666.867837.peg.926	T4S	zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
fig 6666666.867837.peg.1060	T4S	RNA polymerase-binding protein DksA
fig 6666666.867837.peg.1098	T4S	polyphosphate kinase (Polyphosphoric acid kinase) (ATP- polyphosphate phosphotransferase)
fig 6666666.867837.peg.1135	T4S	malate dehydrogenase
fig 6666666.867837.peg.1197	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.867837.peg.1232	T4S	LysR substrate-binding domain-containing protein
fig 6666666.867837.peg.1364	T4S	No significant similarity found
fig 6666666.867837.peg.1384	T4S	tRNA (guanosine(37)-N1)-methyltransferase TrmD
fig 6666666.867837.peg.1450	T4S	EF-hand domain-containing protein
fig 6666666.867837.peg.1695	T4S	TonB-dependent receptor
fig 6666666.867837.peg.1778	T4S	Ribonuclease E (RNase E)
fig 6666666.867837.peg.1836	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.1918	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.2051	T4S	phosphomannomutase
fig 6666666.867837.peg.2095	T4S	c-type cytochrome
fig 6666666.867837.peg.2096	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.2207	T4S	Cache 3/Cache 2 fusion domain-containing protein
fig 6666666.867837.peg.2378	T4S	site-specific integrase
fig 6666666.867837.peg.2609	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.2620	T4S	LacI family transcriptional regulator
fig 6666666.867837.peg.2729	T4S	LemA family protein
fig 6666666.867837.peg.2805	T4S	EF-hand domain-containing protein
fig 6666666.867837.peg.2986	T4S	ABC transporter substrate-binding protein
fig 6666666.867837.peg.3109	T4S	pectate lyase
fig 6666666.867837.peg.3198	T4S	cell division protein FtsQ/DivIB
fig 6666666.867837.peg.3536	T4S	virulence RhuM family protein
fig 6666666.867837.peg.3578	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.3722	T4S	putative phosphodiesterase
fig 6666666.867837.peg.3768	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.867837.peg.3847	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.3848	T4S	alpha-L-fucosidase
fig 6666666.867837.peg.3959	T4S	site-specific integrase
fig 6666666.867837.peg.3990	T4S	methylisocitrate lyase

fig 6666666.867837.peg.4077	T4S	DUF2145 domain-containing protein
fig 6666666.867837.peg.4203	T4S	EcsC protein family protein
fig 6666666.867837.peg.4320	T4S	glucose-6-phosphate dehydrogenase
fig 6666666.867837.peg.4382	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.4388	T4S	DNA-binding protein
fig 6666666.867837.peg.4475	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867837.peg.4542	T4S	ADP-ribosyltransferase domain-containing protein
fig 6666666.867837.peg.4624	T4S	hypothetical protein

CCRMTAQ31		
prot	Pred	Description
fig 6666666.867834.peg.1124	T3S	putative Xanthomonas outer protein L
fig 6666666.867834.peg.1272	T3S	Xanthomonas outer protein P1, type III effector XopP1
fig 6666666.867834.peg.1303	T3S	Xanthomonas outer protein AM
fig 6666666.867834.peg.1326	T3S	type III effector
fig 6666666.867834.peg.1435	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.1436	T3S	avirulence protein
fig 6666666.867834.peg.1494	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.1504	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.2939	T3S	nucleoside hydrolase
fig 6666666.867834.peg.3044	T3S	type III effector HopG1
fig 6666666.867834.peg.4064	T3S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.4297	T3S	serine/threonine-protein kinase
fig 6666666.867834.peg.4352	T3S	HrpF/NolX family T3SS translocon protein
fig 6666666.867834.peg.4354	T3S	Outer protein F1
fig 6666666.867834.peg.113	T4S	ribonuclease G
fig 6666666.867834.peg.233	T4S	pirin family protein
fig 6666666.867834.peg.378	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.416	T4S	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
fig 6666666.867834.peg.436	T4S	rod shape-determining protein MreC
fig 6666666.867834.peg.453	T4S	nicotinate phosphoribosyltransferase
fig 6666666.867834.peg.582	T4S	polyphosphate kinase (Polyphosphoric acid kinase) (ATP- polyphosphate phosphotransferase)
fig 6666666.867834.peg.619	T4S	malate dehydrogenase
fig 6666666.867834.peg.679	T4S	molybdenum cofactor biosynthesis protein B
fig 6666666.867834.peg.715	T4S	LysR substrate-binding domain-containing protein
fig 6666666.867834.peg.875	T4S	type III secretion protein HrpB7
fig 6666666.867834.peg.892	T4S	zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
fig 6666666.867834.peg.1025	T4S	RNA polymerase-binding protein DksA
fig 6666666.867834.peg.1170	T4S	tRNA (guanosine(37)-N1)-methyltransferase TrmD
fig 6666666.867834.peg.1237	T4S	EF-hand domain-containing protein
fig 6666666.867834.peg.1344	T4S	TonB-dependent receptor
fig 6666666.867834.peg.1425	T4S	Rne/Rng family ribonuclease
fig 6666666.867834.peg.1486	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.1567	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.1635	T4S	cell division protein FtsQ/DivIB
fig 6666666.867834.peg.1704	T4S	LemA family protein
fig 6666666.867834.peg.1752	T4S	c-type cytochrome
fig 6666666.867834.peg.1753	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.1861	T4S	phosphomannomutase
fig 6666666.867834.peg.2136	T4S	manganese catalase family protein
fig 6666666.867834.peg.2212	T4S	Cache 3/Cache 2 fusion domain-containing protein

fig 6666666.867834.peg.2383	T4S	site-specific integrase
fig 6666666.867834.peg.2589	T4S	LacI family transcriptional regulator
fig 6666666.867834.peg.2697	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.2714	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.2919	T4S	F0F1 ATP synthase subunit gamma
fig 6666666.867834.peg.2954	T4S	ABC transporter substrate-binding protein
fig 6666666.867834.peg.3106	T4S	pectate lyase
fig 6666666.867834.peg.3356	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.3613	T4S	putative phosphodiesterase
fig 6666666.867834.peg.3658	T4S	nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
fig 6666666.867834.peg.3790	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.3791	T4S	alpha-L-fucosidase
fig 6666666.867834.peg.3936	T4S	site-specific integrase
fig 6666666.867834.peg.3967	T4S	methylisocitrate lyase
fig 6666666.867834.peg.4054	T4S	DUF2145 domain-containing protein
fig 6666666.867834.peg.4147	T4S	conserved hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.4275	T4S	glucose-6-phosphate dehydrogenase
fig 6666666.867834.peg.4371	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.4393	T4S	DNA-binding protein
fig 6666666.867834.peg.4450	T4S	hypothetical protein
fig 6666666.867834.peg.4451	T4S	No significant similarity found
fig 6666666.867834.peg.4529	T4S	virulence RhuM family protein
fig 6666666.867834.peg.4537	T4S	ADP-ribosyltransferase domain-containing protein
fig 6666666.867834.peg.4621	T4S	hypothetical protein

CAPÍTULO IV

Caracterização de biofilme de *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, agente causal da mancha angular do cajueiro

Brazilian Journal of Microbiology

Caracterização de biofilme de *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, agente causal da mancha angular do cajueiro

Lucas Pontes de Lucena¹ · Flávia Figueira Aburjaile² · Elineide Barbosa de Souza³ · Marco Aurélio Siqueira da Gama¹

¹ Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

³ Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Resumo

Xanthomonas citri pv. *anacardii* é o agente causal da mancha angular do cajueiro e da mancha de *Xanthomonas* do cajueiro, sendo capaz de causar perdas quantitativas e qualitativas durante a produção, especialmente na região Nordeste do Brasil, principal região produtora de castanha-de-caju do país. O conhecimento da interação entre a bactéria e o hospedeiro é de ampla importância para o desenvolvimento de estratégias de manejo da doença. O biofilme é um mecanismo de aderência do patógeno a superfícies do hospedeiro, sendo considerado um fator de patogenicidade em espécies do gênero *Xanthomonas*. A motilidade swarming é uma forma de deslocamento das bactérias através dos flagelos, sendo frequentemente relacionada à produção de biofilme em bactérias. Neste contexto, este trabalho teve como finalidade caracterizar a ocorrência dos mecanismos de biofilme e motilidade swarming através de diferentes abordagens *in vitro* e *in vivo* em diferentes isolados de *X. citri* pv. *anacardii*. Nas análises *in vitro*, a maioria dos isolados apresentou o fenótipo de fracos formadores de biofilme, com exceção dos isolados CCRMTAQ13, CCRMTAQ18 e CCRMTAQ29 nos meios YDC, LB e NYD. Quando avaliados *in vivo*, as análises de microscopia ótica não foram observadas estruturas de biofilme, sendo detectada apenas a degradação dos tecidos foliares, enquanto nas análises de microscopia eletrônica foi possível observar formação de biofilme com os isolados CCRMTAQ13, CCRMTAQ18 e IBSBF2579 próxima às aberturas naturais das folhas às 24 e 48h após a inoculação. Com relação à motilidade swarming, todos os isolados avaliados

apresentaram características de crescimento negativo, tendo o isolado CCRMTAQ13 apresentado o maior crescimento (15.176 ± 0.921 mm), porém diferindo significativamente apenas do isolado com menor crescimento IBSBF2579^{PT} (12.507 ± 0.840 mm). Quando avaliada a correlação entre a formação de biofilme e a motilidade swarming, apenas o isolado CCRMTAQ13 teve uma correlação significativa, com valor de 0.6711. Ao observar esses dados, pode-se inferir que a espécie *X. citri* pv. *anacardii* tem no biofilme uma maior relevância nos estágios iniciais de infecção, provavelmente tendo maior importância para a penetração do patógeno no hospedeiro, enquanto os valores de motilidade indicaram a necessidade de deposição de inóculo próxima ao local de penetração para o sucesso da infecção.

Keywords: Bactéria fitopatogênica, motilidade swarming, microscopia eletrônica de varredura, Mancha de *Xanthomonas* do cajueiro

Introdução

Xanthomonas citri pv. *anacardii* é o agente causal da mancha angular, e da mancha de *Xanthomonas* do cajueiro, a qual foi detectada pela primeira vez no Brasil por Robbs et al., (1981) em plantas das regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. Os sintomas que caracterizam a doença são o escurecimento de vasos e lesões necróticas restringidas pelas nervuras foliares, proporcionando o aspecto de mancha angular que dá nome à doença, podendo também infectar galhos, ponteiros (Gama et al., 2011), e frutos, demonstrando capacidade de ocasionar perdas diretas na lavoura (Viana et al., 2007). Por sua capacidade infectiva e de sobrevivência, mesmo quando não encontrada em estado cultivável (Lucena et al., 2022), a ocorrência de *X. citri* pv. *anacardii* no Nordeste demonstra que, apesar de não haver dados quantitativos de perdas até o momento, há um alto potencial de prejuízo econômico causado pelo patógeno (Viana et al., 2007).

Dentre os mecanismos utilizados pela espécie *X. citri* para a infecção, pode-se destacar o biofilme (Zimaro et al. 2014), um mecanismo onde as bactérias se aderem à superfície do hospedeiro através de uma camada composta primeiramente por exopolissacarídeos (EPS) (Huang et al., 2013), além dos EPS o biofilme é composto por outros compostos, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Mina et al. 2019). Essa estrutura polissacarídica

proporciona uma melhor adaptação ambiental do patógeno, modificando as condições do microambiente em que as células inseridas no biofilme se encontram, dando características particulares a essa estrutura, como adesão das células a superfícies e troca de material genético dentro da matriz (Morris and Monier, 2003; Stoodley et al, 2002; Shafiei et al., 2021). De forma geral, a formação de biofilme pode ser dividida em diferentes fases de desenvolvimento, sendo elas: adesão inicial, formação de estrutura espacial, maturação e dispersão (Paluch et al., 2019). A formação de biofilme ocorre através das etapas de adesão reversível de células planctônicas, adesão irreversível, formação de matriz de EPS, maturação do biofilme e dispersão (Janissen et al. 2015) No gênero *Xanthomonas*, o principal EPS relacionado à formação do biofilme é a goma xantana (Felipe et al., 2018). Dentro do gênero *Xanthomonas*, a formação de biofilme é relatada e reconhecidamente relevante para a patogenicidade e virulência em *X. citri* pv. *citri*, sendo demonstrado que isolados com produção de biofilme prejudicada apresentam reduzida capacidade de indução de sintomas, sendo requerido para atingir a plena virulência (Zimaro et al. 2014; Rigano et al., 2007), além disso, isolados com ausência de produção da xantana, apesar de permanecerem patogênicos, demonstram redução da sobrevivência epifítica de *X. citri* pv. *citri* (Dunger et al. 2007).

A motilidade swarming pode ser definida como movimentação multicelular das bactérias sobre uma superfície através dos flagelos (Kearns, 2010), de maneira coordenada entre si, sendo requerido que haja uma determinada quantidade de células para a ativação desse movimento. A motilidade swarming pode ser observada tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas, sendo visualizada mais facilmente em meios sólidos (Verstraeten et al., 2008). Em *Xanthomonas*, a movimentação swarming já foi identificada anteriormente, podendo ser observado que os genes *pilG*, *pilH*, *HpaS* e *VemR* desempenham um papel na regulação da movimentação na espécie *X. campestris* (Qi et al. 2020; Li et al. 2020). Na espécie *X. citri*, o gene *VacJ* está intimamente ligado à motilidade swarming, exercendo controle sobre distintas características do patógeno, como o biofilme e a virulência (Li; Yu, 2020), outros estudos nessa espécie revelam que a variação de temperatura exerce um impacto notável na movimentação swarming, resultando numa considerável diminuição de atividade a 15 °C (Liao et al. 2019).

Diante da relevância do biofilme e da motilidade swarming para o estabelecimento das relações patógeno-hospedeiro através do favorecimento à sobrevivência a fatores ambientais adversos e auxílio no processo de infecção na espécie *X. citri*, este trabalho tem como objetivo caracterizar esses mecanismos em *X. citri* pv. *anacardii* através da avaliação da dinâmica de desenvolvimento de isolados do patovar em diferentes meios de cultura para a observação do biofilme e motilidade, assim como realizar observações da superfície e dos tecidos do hospedeiro durante o processo de infecção para comparar os dados *in vitro* com a patologia *in vivo*.

Material e métodos

Isolados, condições de cultivo e preparo do inóculo

Foram utilizados seis isolados de *X. citri* pv. *anacardii*, sendo os isolados CCRMTAQ11, CCRMTAQ13, CCRMTAQ18, CCRMTAQ24 e CCRMTAQ29 da Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM) e o isolados IBSBF2579^{PT} da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo (IBSBF) (Tabela 1). Fenotipicamente, os isolados obtidos da CCRM apresentam coloração amarela, enquanto o isolado proveniente da IBSBF é apigmentado (Gama et al. 2011). Todos os isolados utilizados neste estudo já foram caracterizados quanto à agressividade ao cajueiro (Gama et al. 2011) e à dinâmica de crescimento (Lucena et al. 2022), e têm seu genoma completamente sequenciado e depositado previamente (Lucena et al. 2023; Gama et al. 2018; Silva Junior et al. 2018). Os isolados foram cultivados em meio NYDA (22 g L⁻¹ ágar, 10 g L⁻¹ glicose, 5 g L⁻¹ extrato de levedurra, 5 g L⁻¹ peptona, 3 g L⁻¹ extrato de carne) durante 36 h. As suspensões bacterianas foram preparadas em água destilada esterilizada (ADE) e ajustadas com o auxílio de espectrofotômetro para a DO₅₇₀ = 0,06, que corresponde à concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹.

Formação de biofilme *in vitro*

Os experimentos foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato usando quatro meios de cultura líquidos: Luria–Bertani

(LB) (10 g L⁻¹ triptona, 5 g L⁻¹ extrato de leveduura, 5 g L⁻¹ NaCl), 100g nutriente dextrose extrato de levedura (NYD), trypan blue sem tetraciclina (TB) (2 g L⁻¹ glicose, 1 g L⁻¹ asparagina, 1 g L⁻¹ NaHCO₃, 0.5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.01 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0.05 g L⁻¹ trypan blue), e extrato de levedura dextrose carbonato de cálcio (YDC) (10 g L⁻¹ extrato de levedura, 20 g L⁻¹ dextrose, 20 g L⁻¹ carbonato de cálcio). A formação de biofilme foi avaliada pelo método de quantificação colorimétrica com cristal violeta (Antunes et al. 2010), onde os poços foram preenchidos com 140µL de meio de cultura, 40µL de suspensão bacteriana e 20 µL de ADE. O controle negativo foi realizado através do depósito de ADE em vez de suspensão bacteriana. O conteúdo dos poços foi então incubado durante 36 h a uma temperatura de 29 °C e em seguida foi realizada tríplice lavagem das placas com solução salina esterilizada a 0.9%. Foi então realizada a fixação das células restantes nos poços através de calor seco à temperatura de 60 °C por 1h. Os poços foram então preenchidos com 200µL de cristal violeta e incubados à temperatura ambiente durante 15 min. Em seguida, foi realizada a lavagem com água corrente e o cristal violeta aderido à camada de biofilme foi solubilizada em 200 µL de etanol (99.5%) por 15 min.

A capacidade de formação de biofilme de cada isolado foi determinada por meio dos seguintes critérios: $DO_t \leq DO_c$ = não aderente, $OD_c \leq OD_t \leq (2 \times OD_c)$ = fraco formador de biofilme, $(2 \times OD_c) \leq OD_t \leq (4 \times OD_c)$ = formador moderado, e $(4 \times OD_c) \leq OD_t$ = forte formador, onde DO_t refere-se a densidade ótica dos tratamentos e DO_c refere-se a densidade ótica do controle (Stepanovic et al. 2000). O experimento foi realizado em arranjo fatorial 4 x 6 (quatro meios de cultura e seis isolados de *X. citri* pv. *anacardii*). O experimento foi realizado 2 vezes com 8 repetições por tratamento, nas quais cada repetição foi composta por 3 poços contendo cada meio de cultura para cada isolado avaliado.

Inoculação e Formação de biofilme *in vivo*

A formação de biofilme foi avaliada *in vivo* através dos métodos de microscopia ótica luminosa e microscopia eletrônica de varredura. Os isolados CCRMTAQ13, CCRMTAQ18 e IBSBF2579^T foram inoculados por meio de ferimentos realizados no limbo foliar de folhas de cajueiro (clone CCP 76) com o auxílio de alfinete entomológico, e posterior deposição de 10 µL de suspensão

bacteriana. Folhas tratadas similarmente com ADE foram utilizadas como testemunha negativa. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação (30 ± 2 °C) para avaliação às 24 h, 48 h e 25 dias após a inoculação.

Para o preparo de amostras para a microscopia ótica luminosa retirou-se fragmentos de aproximadamente 4 mm de largura e 4mm de comprimento, na área de transição entre os tecidos doente e sadio das folhas. Os fragmentos foram fixados em solução FAA (5% formaldeído, 5% etanol, 90% ácido acético) durante 24h e preservados em álcool etílico (70%). Os fragmentos foram desidratados em álcool e diafanizados em xylol por 10 min, sendo emblocados em parafina líquida em estufa à temperatura de 60 °C. Os blocos foram seccionados em uma espessura de 5 µm com o auxílio de um micrótomo. Em seguida, as secções foram depositadas em lâminas e coloridas através do método da hematoxilina-eosina (Caputo, Gitirana, Manso, 2010), sendo mantidas em estufa a 35 °C por 24h. As análises histológicas foram realizadas com o auxílio de microscópio ótico e as imagens foram capturadas através de uma câmera digital (Nikon Eclipse INU) acoplada ao microscópio.

Para a observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV), os fragmentos foram submetidos à temperatura de -80 °C por 24h, e em seguida, liofilizados. Posteriormente, foram metalizados com ouro e observados ao MEV a 15 kV conforme descrito por Silva et al. (2021).

Motilidade Swarming

Foram depositados 10µL de suspensão bacteriana dos isolados CCRMTAQ11, CCRMTAQ13, CCRMTAQ18, CCRMTAQ24 e CCRMTAQ29 e IBSBF2579^{PT} no centro de placas de Petri com 15 mL de meio de cultura de motilidade (10g/L de triptona, 5g/L de NaCl e 5g/L de ágar). Após 72h de incubação a 29 °C, o diâmetro das colônias foi medido com o auxílio de um paquímetro. O experimento foi realizado três vezes com 5 repetições.

Análises estatísticas e ilustrações

Os experimentos de análise de biofilme foram realizados em um desenho experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial. Os pressupostos da análise de variância foram avaliados por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene. As comparações entre médias foram realizadas usando o teste de

diferença menos significativa (LSD). Um teste de correlação de Pearson ($P < 0,05$) foi realizado para investigar a correlação entre a formação de biofilme in vitro e a motilidade swarming em todos os isolados.

As análises de Shapiro-Wilk, Levene, testes de LSD, arranjo fatorial e correlação de Pearson foram realizadas com o auxílio do software Statistix (Tallahassee, FL, USA). As ilustrações foram realizadas através do software SigmaPlot (version 14.0).

Resultados

Formação de biofilme in vitro

Todos os isolados foram capazes de formar biofilme nos níveis fraco ou moderado, em todos os meios analisados, com exceção do isolado CCRMTAQ11, que não formou biofilme no meio YDC (**Fig. 1**). Os isolados CCRMTAQ13, CCRTAQ18 e CCRMTAQ29 foram considerados formadores moderados de biofilme nos meios YDC, LB e NYD, respectivamente, enquanto os demais isolados foram fracos formadores de biofilme em todos os meios analisados. O meio NYD induziu os maiores valores de absorbância para maioria dos isolados (**Tabela 2**), uma vez que o isolado CCRMTAQ29 apresentou maior absorbância em meio YDC, embora sem diferir significativamente da absorbância observada no meio NYD. No meio TB todos os isolados foram fracos formadores de biofilme.

Formação de biofilme in vivo

As observações realizadas em microscopia ótica demonstraram uma clara degradação das células, conforme o progresso da doença até os 25 dias após a inoculação dos isolados CCRMTAQ13, CCCRMTAQ18 e IBSBF2579^{PT} (**Fig. 2 a-f**), diferentemente dos tecidos tratados com ADE (**Fig. 2 g-h**). Contudo, nos tecidos analisados não foi observada a presença de células planctônicas de *X. citri* pv. *anacardii* ou a formação de biofilme pelo patógeno.

As observações realizadas ao MEV da superfície foliar de mudas de cajueiro clone CCP76 demonstraram a presença de células de *X. citri* pv. *anacardii*, assim como o crescimento de biofilme às 24 e 48 h após a inoculação

com os isolados CCRMTAQ13, CCCRMTAQ18 e IBSBF2579 (**Fig. 3 a1-a2, b1-b2 e c1-c2**). Aos 25 dias após a inoculação, não foi possível observar a formação de biofilme, e foram identificadas poucas células planctônicas nas folhas inoculadas (**Fig. 3 a3, b3 e c3**). A quantidade de células observadas no tecido foliar variou de acordo com o tempo. Nesse sentido, quando comparados conforme a progressão no tempo, os isolados IBSBF2579^{PT} e CCRMTAQ13 apresentaram maior quantidade de células na superfície foliar às 24h após a inoculação (**Fig. 3 a1 e c1**), enquanto o isolado CCRMTAQ18 apresentou maior crescimento de células e maior quantidade de biofilme às 48h após a inoculação (**Fig. 3 b2**). A morfologia dos biofilmes formados pelos três isolados foi semelhante, sendo observadas matrizes tridimensionais em formato de concha com múltiplas camadas às 24h após a inoculação (**Fig. 4 a1, b1 e c1**), e tomando aspecto de blocos às 48h, sendo ainda possível observar algumas camadas em suas estruturas (**Fig. 4 a2, b2 e c2**). Nos três isolados, os biofilmes não permitiram a diferenciação das células inseridas nas estruturas de polissacarídeo, tanto às 24h quanto às 48h após a inoculação (**Fig. 4 a1-c2**).

Motilidade Swarming Todos os isolados apresentaram características do fenótipo negativo da motilidade swarming, caracterizada pelo crescimento circular da colônia restrito ao centro da placa de Petri (Silva et al., 2021). Em relação ao tamanho, somente houve diferença significativa ($P < 0.05$) entre os crescimentos do isolado CCRMTAQ13 (15.176 ± 0.921 mm) e do isolado IBSBF2579^{PT} (12.507 ± 0.840 mm). A análise de correlação de Pearson demonstrou uma correlação significativa entre a motilidade swarming e a formação de biofilme *in vitro*, tendo sido identificada a correlação positiva entre o isolado CCRMTAQ13 no meio TB e a sua motilidade swarming (0.6711).

Discussão

A formação de biofilme *in vitro* dos isolados avaliados neste estudo apresentou características similares entre si para a maioria dos meios de cultura avaliados, tendo uma ampla maioria de isolados classificados como fracos formadores, semelhantemente ao observado em isolados de *X. citri* pv. *viticola* (Guerra et al., 2017). Em *X. citri* pv. *citri* foi observado que a bactéria apresenta

reduzida capacidade de sobrevivência quando está fora do tecido do hospedeiro, assim como em materiais inertes, como metal e plástico (Graham et al. 2003; Gottwald et al. 2006). Em relação aos meios de cultura, o NYD proporcionou maior formação de biomassa para a maior parte dos isolados avaliados, diferindo do observado em estudos que utilizaram os mesmos meios de cultura em outras bactérias fitopatogênicas da mesma espécie (Guerra et al., 2017), e com isolados fitopatogênicos do gênero *Burkholderia* (Silva et al., 2021).

A impossibilidade de detecção de biofilme no interior dos tecidos do hospedeiro em contraste com sua observação na superfície foliar sugere que esse mecanismo atua de maneira diferente uma vez instalado nos espaços intercelulares da planta, ainda que tenha sido observada a degradação celular decorrente da infecção por *X. citri* pv. *anacardii* (**Fig. 2 b, d, f**), os resultados demonstram uma provável diferenciação na interação patógeno-hospedeiro em relação a outros isolados de *Xanthomonas*, como *X. albilineans* e *X. citri* pv. *viticola*, nos quais foi possível observar a presença de agregados de células em tecidos infectados (Tostes et al. 2014; Mensi et al. 2014).

A presença de biofilme na superfície foliar demonstrada nas observações realizadas em MEV indica que a formação de biofilme é importante para a penetração do patógeno no hospedeiro iniciando o processo de colonização, em conformidade com estudos realizados em *X. citri* pv. *citri* (Das, 2003). A formação de biofilme observada em MEV demonstrou uma estrutura em blocos (**Fig. 4 a2, b2, c2**) em contraste com *X. campestris* pv. *campestris* (Dow et al. 2003).

Embora o biofilme seja um importante fator de virulência observado em patovares de *X. citri* (Huang et al., 2013; Sena-Vélez et al., 2015), nesse estudo a maior quantidade de biofilme formada por *X. citri* pv. *anacardii* foi observada na parte externa das folhas às 24 e 48h após a inoculação (**Fig. 3a1-a2, b1-b2 e c1-c2**), da mesma forma, pôde-se observar a ausência de biofilme nos cortes histológicos, sugerindo que sua maior relevância no estabelecimento da infecção do cajueiro por *X. citri* pv. *anacardii* esteja nas fases iniciais da interação patógeno hospedeiro. Quanto à morfologia do biofilme, os isolados CCRMTAQ13 e CCRMTAQ18 apresentaram formato de concha, características estruturais semelhantes a outros isolados de *Xanthomonas*, como *X. citri* pv. *citri* (Redondo et al., 2015) e outros patógenos de plantas, como *Burkholderia cenocepacia* (Silva et al., 2021). Os dados obtidos nesse estudo evidenciaram a

eficácia da análise do biofilme pela comparação do seu desenvolvimento *in vitro* e *in vivo*.

A motilidade swarming negativa foi semelhante em todos os isolados estudados, demonstrando ser uma característica comum dentro do patovar. Embora não tenha havido correlação significativa observada entre a formação de biofilme e a motilidade swarming para todos os isolados, com exceção de CCRMTAQ13, pôde-se verificar que os dados obtidos estão em conformidade com a literatura, visto que bactérias com motilidade reduzida tendem a apresentar maior dificuldade de formação do biofilme (Antony et al. 2017), o que pode estar relacionado ao fato de que a maioria dos isolados avaliados foram classificados como fracos ou médios formadores de biofilme nos quatro meios de cultura utilizados (**Fig. 1**). Em outros isolados do gênero *Xanthomonas* é observado que isolados com maior motilidade são capazes de causar maiores severidades, como *X. vesicatoria* (Felipe et al. 2018), enquanto essa relação não foi observada com os isolados de *X. citri* pv. *anacardii* avaliados nesse estudo (**Tabela 1; Fig. 5**).

Dessa forma, foi possível caracterizar o fenótipo de biofilme *in vitro* e *in vivo*, a dinâmica de motilidade swarming *in vitro* e sua correlação com a formação de biofilme de *X. citri* pv. *anacardii*. Dessa forma as informações observadas neste trabalho indicam que a formação de biofilme tem a importância de auxiliar a penetração do patógeno no intervalo das primeiras 24-48h após a deposição na superfície foliar do hospedeiro. Por outro lado, os valores de motilidade indicam a necessidade de que a deposição do inóculo ocorra próxima ao seu local de penetração, permitindo inferir que caso o inóculo seja depositado em pontos mais distantes desse local não resultarão em uma infecção bem-sucedida. Os dados obtidos nesse estudo permitiram identificar a ocorrência de biofilme na espécie *X. citri* pv. *anacardii* por meio de análises *in vitro* e *in vivo*, possibilitando o conhecimento de características desse patógeno com o hospedeiro. Esse estudo também é útil para a caracterização da motilidade swarming em *X. citri* pv. *anacardii*, sendo também uma fonte de conhecimento para esse tipo de motilidade, podendo ser somada aos dados já disponíveis em relação às motilidades twitching e swimming da espécie *X. citri* (Sena-Vélez et al., 2015; Dunger et al., 2014).

Author contribution Conceived or designed the study: all authors.
Performed research: Lucena LP. Analyzed data: Lucena LP. Wrote the paper:
Lucena LP, Aburjaile FF, Souza EB, and Gama MAS.

Funding Lucas Pontes de Lucena thanks the Brazilian National Research
Council (CNPq) for the scholarship awarded (process number 140052/2020-8).

Data availability The data that support the findings of this study are available
from the corresponding author upon reasonable request.

Code availability Not applicable.

Declarations

Ethics approval Not applicable.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Competing interests These authors declare no competing interests.

Referências

- Antony AR, Janani R, Rajesh Kannan V. Biofilm instigation of plant pathogenic bacteria and its control measures. *Biofilms in Plant and Soil Health*. 2017;409–38. doi:10.1002/9781119246329.ch21
- Antunes AL, Trentin DS, Bonfanti JW, Pinto CC, Perez LR, Macedo AJ, Barth AL (2010) Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 118:873–877. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02681.x>
- Caputo LFG, Gitirana LB, Manso PPA (2010) Técnicas histológicas. In: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeiro MR (eds) *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*, 2nd edn. EPSJV, IOC, Rio de Janeiro, pp 89–174
- Das AK. Citrus canker - a review. *Journal of Applied Horticulture*. 2003;05(01):52–60. doi:10.37855/jah.2003.v05i01.15
- Dow JM, Crossman L, Findlay K, He Y-Q, Feng J-X, Tang J-L. Biofilm dispersal in *xanthomonas campestris* is controlled by cell–cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(19):10995–1000. doi:10.1073/pnas.1833360100
- Dunger G, Relling VM, Tondo ML, Barreras M, Ielpi L, Orellano EG, et al. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* Epiphytic Survival. *Archives of Microbiology*. 2007;188(2):127–35. doi:10.1007/s00203-007-0227-8
- Dunger, G, Guzzo, CR, Andrade, MO, Jones, JB; Farah, CS. (2014). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type IV pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 27(10), 1132–1147. doi:10.1094/mpmi-06-14-0184-r
- Felipe V, Romero AM, Montecchia MS, Vojnov AA, Bianco MI, Yaryura PM. *xanthomonas vesicatoria* virulence factors involved in early stages of bacterial spot development in tomato. *Plant Pathology*. 2018;67(9):1936–43. doi:10.1111/ppa.12905
- Felipe, V., A. M. Romero, M. S. Montecchia, A. A. Vojnov, M. I. Bianco, and P. M. Yaryura. *Xanthomonas vesicatoria* Virulence Factors Involved in Early Stages of Bacterial Spot Development in Tomato. *Plant Pathology* 67, no. 9 (2018): 1936–43. <https://doi.org/10.1111/ppa.12905>.
- Fonseca SC, Silva CL, Xavier MF (2005) Microstructural analysis of fresh-cut red bell pepper (*Capsicum annuum* L.) for postharvest quality optimization. *Electron J Environ Agric Food Chem* 3:1081–1085
- Gama MA, Mariano RL, Silva Júnior WJ, Farias AR, Barbosa MA, Ferreira MA, et al. Taxonomic repositioning of *xanthomonas campestris* pv. *viticola* (nayudu

404 1972) dye 1978 as *xanthomonas citri* pv. *viticola* (nayudu 1972) dye 1978
 405 comb. nov. and emendation of the description of *xanthomonas citri* pv. *anacardii*
 406 to include pigmented isolates pathogenic to cashew plant. *Phytopathology*®.
 407 2018;108(10):1143–53. doi:10.1094/phyto-02-18-0037-r

408 Gama MA, Mariano RL, Viana FM, Ferreira MA, Souza EB. Polyphasic
 409 characterization of pigmented strains of *xanthomonas* pathogenic to cashew
 410 trees. *Plant Disease*. 2011;95(7):793–802. doi:10.1094/pdis-05-10-0321

411 Gama, MAS, Mariano, RLR, Viana, FMP, Ferreira, MASV, and Souza, EB 2011.
 412 Polyphasic Characterization of Pigmented Strains of *Xanthomonas* Pathogenic
 413 to Cashew Trees. *Plant Dis*. 95:793–802.

414 Gottwald T, Graham J, Bock C, Bonn G, Civerolo E, Irey M, et al. The
 415 epidemiological significance of post-packinghouse survival of *xanthomonas citri*
 416 subsp. *citri* for dissemination of asiatic citrus canker via infected fruit. *Crop*
 417 *Protection*. 2009;28(6):508–24. doi:10.1016/j.cropro.2009.02.003

418 Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, Achor DS. *xanthomonas axonopodis* pv.
 419 *citri*: Factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant*
 420 *Pathology*. 2003;5(1):1–15. doi:10.1046/j.1364-3703.2004.00197.x

421 Guerra ML, Malafaia CB, Macedo AJ, Silva MV, Mariano RLR, Souza EB
 422 (2017) Biofilm formation by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* affected by
 423 abiotic surfaces and culture media. *Trop Plant Pathol* 43(2):146–151.
 424 <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0190-0>

425 Huang T-P, Lu K-M, Chen Y-H (2013) A novel two-component response
 426 regulator links RPF with biofilm formation and virulence of *Xanthomonas*
 427 *axonopodis* pv. *citri*. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0062824

428 IBGE. 2021. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA.
 429 Available: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa>. Accessed 26 January 2023.

430 Janissen R, Murillo DM, Niza B, Sahoo PK, Nobrega MM, Cesar CL, et al.
 431 Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and
 432 filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation.
 433 *Scientific Reports*. 2015;5(1). doi:10.1038/srep09856

434 Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol*
 435 8(9):634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>

436 Li R, Wang X, Wu L, Huang L, Qin Q, Yao J, et al. *xanthomonas campestris*
 437 sensor kinase hpas co-opts the orphan response regulator vemr to form a
 438 branched two-component system that regulates motility. *Molecular Plant*
 439 *Pathology*. 2020;21(3):360–75. doi:10.1111/mpp.12901

440 Li Y, Yu Q. Role of the lipoprotein VACJ/mlaa in the physiology and virulence of
 441 the plant pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Physiological and Molecular*
 442 *Plant Pathology*. 2020;112:101546. doi:10.1016/j.pmpp.2020.101546

443 Liao J-X, Li K-H, Wang J-P, Deng J-R, Liu Q-G, Chang C-Q. RNA-seq analysis
 444 provides insights into cold stress responses of *xanthomonas citri* pv. *Citri*. BMC
 445 Genomics. 2019;20(1). doi:10.1186/s12864-019-6193-0

446 Lucena LP, Benko-Iseppon AM, Brenig B, Azevedo V, Aburjaile F, Souza EB, et
 447 al. Draft genome sequence of seven pigmented strains of *xanthomonas citri* pv.
 448 *anacardii*, the causal agent of cashew angular spot. *Phytopathology*®.
 449 2023;113(7):1360–4. doi:10.1094/phyto-08-22-0279-a

450 Lucena, LP., Albuquerque, GR, Souza, EB, Benko-Iseppon, AM., Carvalho, R.
 451 D., Aburjaile, FF, Gama, MAS. (2022). Infectivity of viable but non-cultivable
 452 cells of pigmented and nonpigmented *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* strains
 453 demonstrate the need to establish indexing protocols for cashew propagules.
 454 *Bacteria*, 1(4), 207-217. doi:10.3390/bacteria1040016

455 Mensi I, Vernerey M-S, Gargani D, Nicole M, Rott P. Breaking dogmas: The
 456 plant vascular pathogen *xanthomonas albilineans* is able to
 457 invade non-vascular tissues despite its reduced genome. *Open Biology*.
 458 2014;4(2):130116. doi:10.1098/rsob.130116

459 Mina IR, Jara NP, Criollo JE, Castillo JA. The critical role of biofilms in bacterial
 460 vascular plant pathogenesis. *Plant Pathology*. 2019;68(8):1439–47.
 461 doi:10.1111/ppa.13073

462 Paluch, E, Rewak-Soroczyńska, J, Jędrusik, I, Mazurkiewicz, E, Jermakow, K.
 463 (2020). Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied*
 464 *Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 1871-1881. doi:10.1007/s00253-020-
 465 10349-w

466 Qi Y-H, Huang L, Liu G-F, Leng M, Lu G-T. Pilg and pilh antagonistically control
 467 flagellum-dependent and pili-dependent motility in the phytopathogen
 468 *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *BMC Microbiology*. 2020;20(1).
 469 doi:10.1186/s12866-020-1712-3

470 Rashid MH, Kornberg A (2000) Inorganic polyphosphate is needed for
 471 swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*.
 472 *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4885–4890.
 473 <https://doi.org/10.1073/pnas.060030097>

474 Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, et al (2007) Biofilm Formation, Epiphytic
 475 Fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.
 476 *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 20:1222–1230. doi: 10.1094/mpmi-20-
 477 10-1222

478 Sena-Vélez M, Redondo C, Gell I, Ferragud E, Johnson E, Graham JH, Cubero
 479 J (2015) Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different
 480 citrus host range. *Plant Pathol* 64:767–775. <https://doi.org/10.1111/ppa.12311>

481 Shafiei SN, Ahmad K, Ikhsan NF, Ismail SI, Sijam K. Suppression of
 482 *xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* biofilm formation by *Acacia mangium* methanol

483 leaf extract. Brazilian Journal of Biology. 2021;81(1):11–7. doi:10.1590/1519-
484 6984.206124

485 Silva Junior WJ, Farias AR, Lima NB, Benko-Iseppon AM, Aburjaile F, Balbino
486 VQ, et al. Complete genome sequence of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*
487 pv. *citri* strain IBSBF2579 from Brazil. Genome
488 Announcements. 2018;6(5). doi:10.1128/genomea.01574-17

491 Silva, PH, Assunção, EF, Velez, LS, Santos, LN, Souza, EB, Gama, MAS
492 (2021). Biofilm formation by strains of *Burkholderia cenocepacia* lineages IIIA
493 and IIIB and *B. Gladioli* pv. *allicola* associated with onion bacterial scale rot.
494 Brazilian Journal of Microbiology, 52(4), 1665-1675. doi:10.1007/s42770-021-
495 00564-6

496 Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M (2000) A
497 modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm
498 formation. J Microbiol Methods 40(2):175–179. [https://doi.org/10.1016/s0167-](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6)
499 7012(00)00122-6

500 Tostes G de, Araujo JS, Farias AR, Frade DÂ, Olivares FL. Detection and
501 cellular localization of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in seeds of
502 commercial “Red Globe” grapes. Tropical Plant Pathology. 2014;39(2):134–40.
503 doi:10.1590/s1982-56762014000200004

504 Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaer J, Vermant J,
505 Michiels J (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation. Trends
506 Microbiol 16(10):496–506. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.004>

507 Viana, FMP., Cardoso, JE, Saraiva, HAO, Ferreira, MASV, Mariano, RLR., and
508 Trindade, LC. 2007. First Report of a Bacterial Leaf and Fruit Spot of Cashew
509 Nut (*Anacardium occidentale*) Caused by *Xanthomonas campestris* pv.
510 *mangiferaeindicae* in Brazil. Plant Dis. 91:1361–1361.

511 Zimaro T, Thomas L, Marondedze C, Sgro GG, Garofalo CG, Ficarra FA, et al.
512 The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp.
513 *citri* biofilm formation. BMC Microbiology. 2014;14(1). doi:10.1186/1471-2180-
514 14-96

515

Tabela 1 Isolados de *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* usados neste trabalho.

Isolados ^a	Espécie	Presença de pigmento	Agressividade ^b
CCRMTAQ13	<i>X. citri</i> pv. <i>anacardii</i>	Pigmented	Aggressive
CCRMTAQ18	<i>X. citri</i> pv. <i>anacardii</i>	Pigmented	Very aggressive
IBSBF2579	<i>X. citri</i> pv. <i>anacardii</i>	Nonpigmented	Low aggressive
CCRMTAQ11	<i>X. citri</i> pv. <i>anacardii</i>	Pigmented	Low aggressive
CCRMTAQ24	<i>X. citri</i> pv. <i>anacardii</i>	Pigmented	Low aggressive
CCRMTAQ29	<i>X. citri</i> pv. <i>anacardii</i>	Pigmented	Low aggressive

^aCCRM = Coleção de Culturas Rosa Mariano do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade federal rural de Pernambuco (UFRPE), Pernambuco, Brasil. IBSBF = Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo.

^b Níveis de agressividade definidos com base nos trabalhos de Gama et al. 2011 e Gama et al. 2018.

Table 2 Interação entre meios de cultura e isolados de *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* na formação de biofilme em superfícies inertes

Meio de Cultura	Isolado					
	CCRMTAQ 13	CCRMTAQ 18	IBSBF25 79	CCRMTAQ 11	CCRMTA Q24	CCRMTAQ 29
NYD	0,49 ^x aC ^y	0,66 aB	0,39 aD	0,86 aA	0,46 aC	0,35 aD
LB	0,27 cBC	0,37 bA	0,19 cD	0,31 bB	0,21 bD	0,24 bCD
YDC	0,42 bA	0,20 cCD	0,32 bB	0,15 cD	0,24 bC	0,40 aA
TB	0,16 dA	0,14 cA	0,13 cA	0,17 cA	0,13 cA	0,17 cA

^xDensidade Ótica

^yMédias de oito repetições obtidas em dois experimentos independentes. Médias seguidas pela(s) mesma(s) letra(s) minúscula(s) na coluna e maiúscula(s) na linha não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$). Meios de cultura: NYD (nutriente-dextrose-extrato de levedura), YDC (extrato de levedura-dextrose-carbonato de cálcio), LB (Luria-Bertani) e TB (ágar azul de tripano sem tetraciclina).

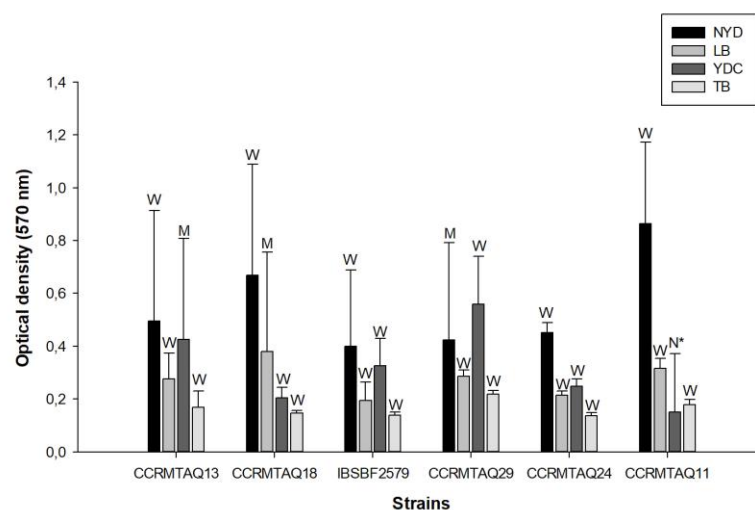


Fig. 1 Capacidade de formação de biofilme por diferentes isolados de *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* em placas de microtitulação de poliestireno. Meios de cultura: NYD (nutriente-dextrose-extrato de levedura), YDC (extrato de levedura-dextrose-carbonato de cálcio), LB (Luria-Bertani) e TB (ágar azul de tripano sem tetraciclina). As barras indicam médias de oito repetições obtidas em dois experimentos independentes; a barra de erro representa o desvio padrão. N*, não aderente; W, fraco; M, moderado; e S, forte (Stepanovic et al. 2000).

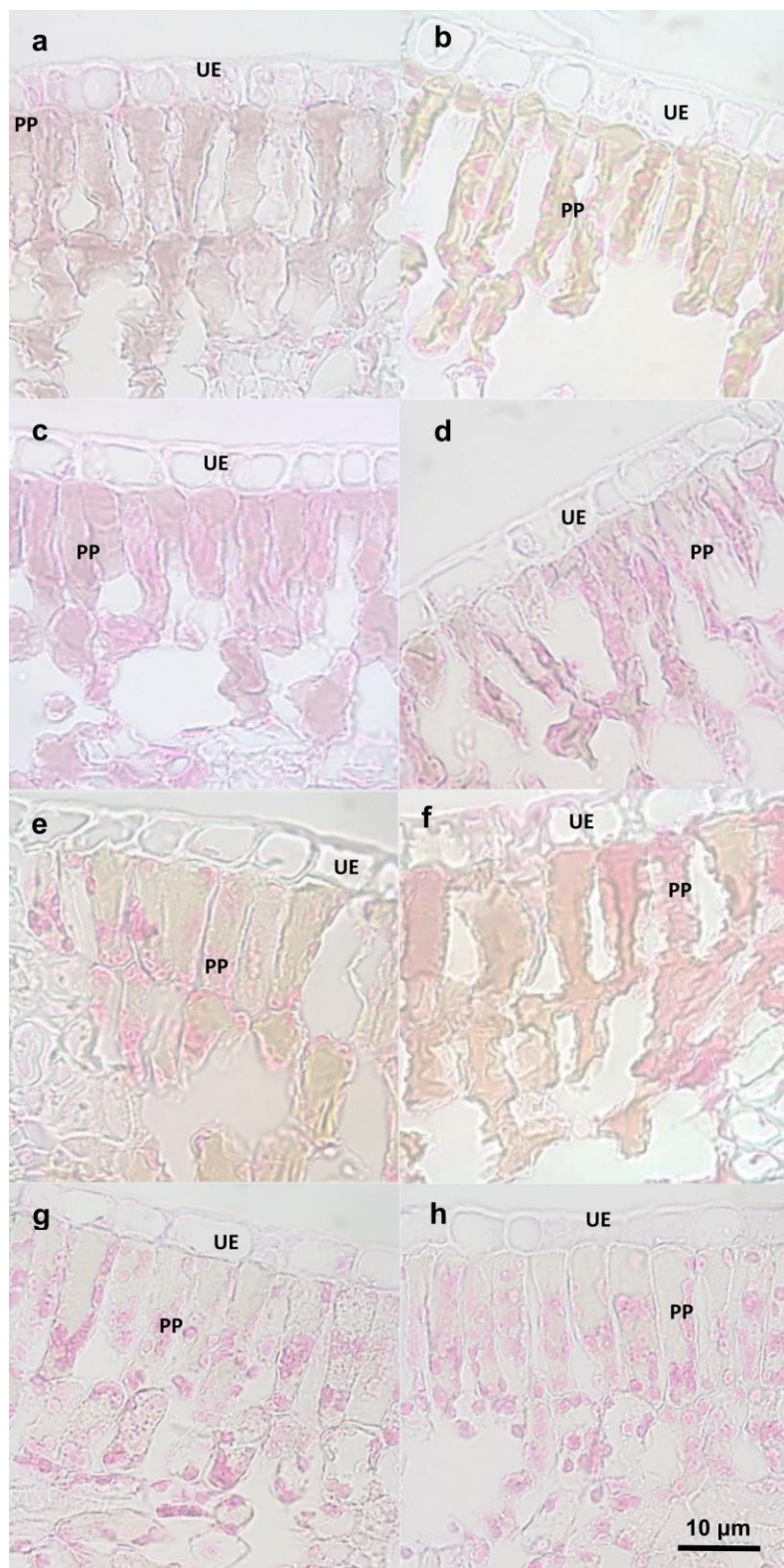


Fig 2. Imagens histológicas de folhas de cajueiro colonizadas por *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, isolados CCRMTAQ13, CCRMTAQ18, IBSBF e controle não inoculado. (a)CCRMTAQ18 24 h; (b)CCRMTAQ18 25 dias; (c)IBSBF2579 24h; (d)IBSBF2579 25 dias; (e)CCRMTAQ13 24 h; (f)CCRMTAQ13 25 dias; (g)Controle não inoculado 24 h; (h)Controle não inoculado 25 dias. UE, epiderme superior; PP, tecido de parênquima paliádico. Ampliação = 100 ×.

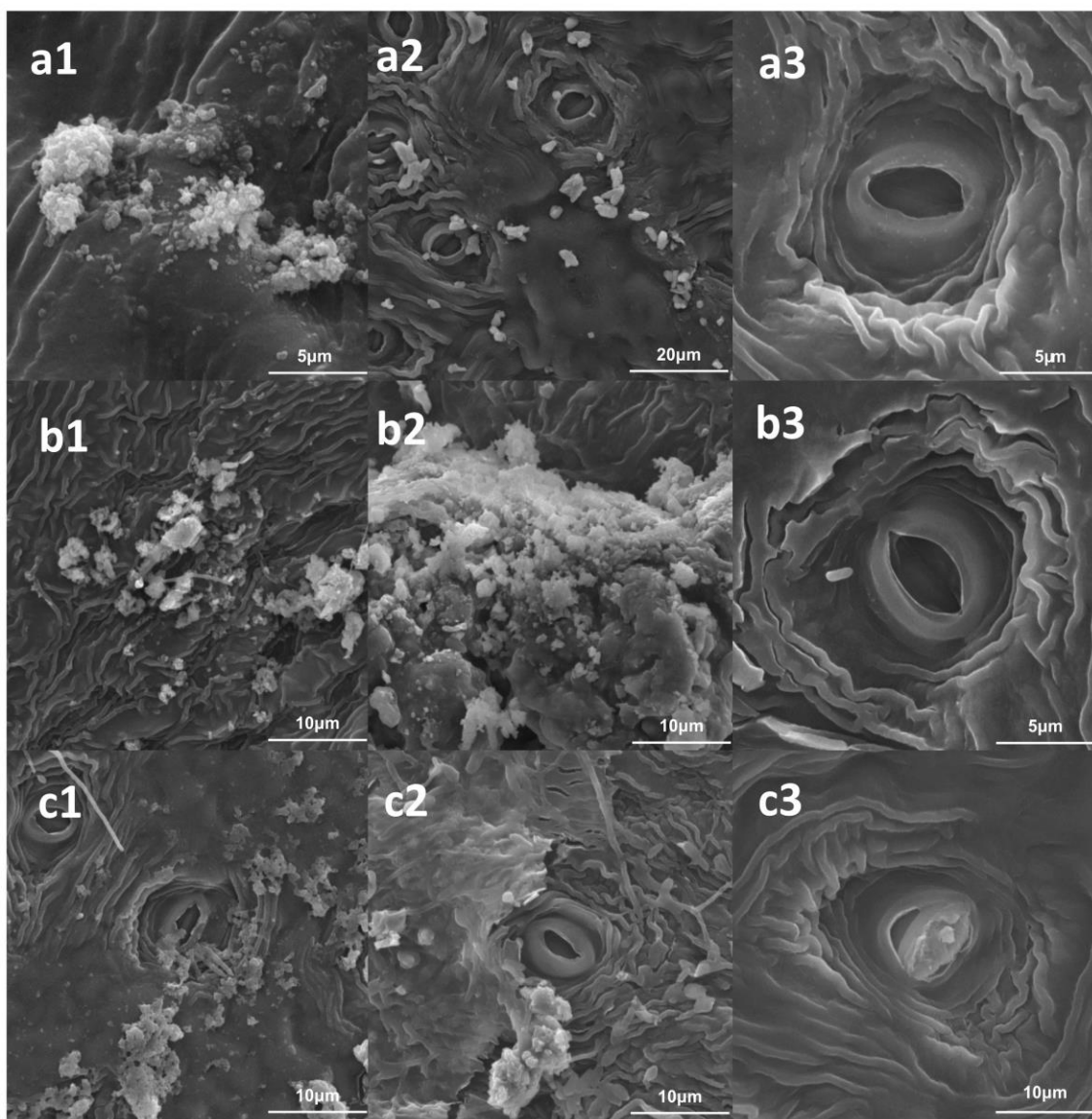


Fig 3. Micrografias eletrônicas de varredura da formação de biofilme em folhas de cajueiro colonizadas por *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*. (a)IBSBF (24h, 48h, 25 dias); (b)CCRMTAQ18 (24h, 48h, 25 dias); (c)CCRMTAQ13 (24, 48h, 25 dias).

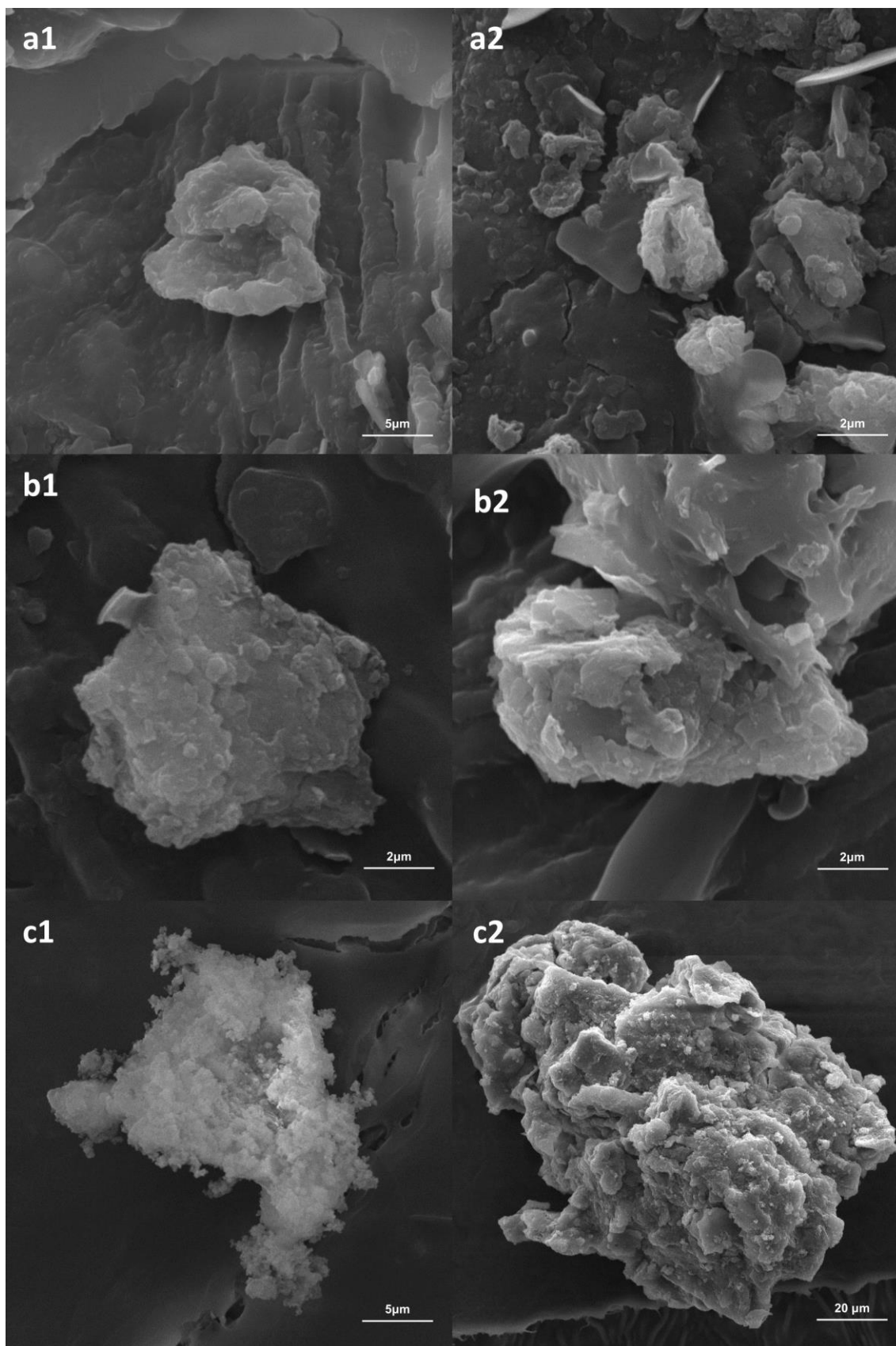


Fig 4. Micrografias eletrônicas de varredura de diferentes morfologias de biofilmes formados por *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* em folhas de cajueiro. (a)CCRMTAQ13 (24h, 48h); (b)IBSBF2579 (24h, 48h); (c)CCRMTAQ18 (24, 48h).

CAPÍTULO V

Conclusões gerais

Conclusões gerais

Os isolados de *X. citri* pv. *anacardii* são formadores de biofilme, entretanto a maioria são fracos ou médios formadores nos meios YDC, LB, TB e NYD.

Os isolados CCRMTAQ13, CCRMTAQ18 e IBSBF2579 de *X. citri* pv. *anacardii* avaliados nesse estudo demonstraram capacidade de formação de biofilme na superfície do tecido hospedeiro, sugerindo que o biofilme é essencial ao estabelecimento da infecção.

A impossibilidade de observar a formação de biofilme dos isolados CCRMTAQ13, CCRMTAQ18 e IBSBF2579 de *X. citri* pv. *anacardii* no interior do tecido hospedeiro sugere que o biofilme tem importância reduzida após o estabelecimento da infecção.

Todos os isolados sequenciados nesse estudo são pertencentes à espécie *X. citri*, possuindo valores de ANI acima de 95% e dDDH acima de 70% em relação a todos os isolados tipo e patotipo da espécie.

Todos os isolados sequenciados nesse estudo apresentaram valores de ANI acima de 99% e dDDH acima de 90% em relação aos respectivos isolados patotipo.

Os genomas de todos os isolados de *X. citri* sequenciados nesse estudo apresentam sequências preditas como genes codificantes para proteínas efetoras dos tipos III e IV em conformidade com estudos anteriores.

Todos os isolados de *X. citri* sequenciados nesse estudo apresentaram pelo menos um locus relacionado à ocorrência de CRISPR-cas, nos quais os isolados dos patovares *X. citri* pv. *anacardii* e *X. citri* pv. *citri* demonstraram pertencer à classe I.